

N° d'Ordre A O : 8321

Année 1973

THÈSE

PRÉSENTÉE

A L'U. E. R. EXPÉRIMENTALE ET PLURIDISCIPLINAIRE
DE LUMINY

UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE II

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

MARIUS SANTIMONE

MÉCANISMES DES RÉACTIONS D'OXYDATION PEROXYDATIVE

Soutenue le 7 Mai 1973 devant la Commission d'Examen :

M. J. RICARD..... Président

M. M. LAZDUNSKI	}	Examineurs
M. G. NOAT		
M. J.M. SURZUR.....		

N° d'Ordre A O : 8321

Année 1973

THÈSE

PRÉSENTÉE

A L'U. E. R. EXPÉRIMENTALE ET PLURIDISCIPLINAIRE
DE LUMINY
UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE II

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

MARIUS SANTIMONE

MÉCANISMES DES RÉACTIONS D'OXYDATION PEROXYDATIVE

Soutenue le 7 Mai 1973 devant la Commission d'Examen :

M. J. RICARD..... Président

M. M. LAZDUNSKI	}	Examineurs
M. G. NOAT		
M. J.M. SURZUR		



Digitized by the Internet Archive
in 2026



UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE

U.E.R. EXPERIMENTALE ET PLURIDISCIPLINAIRE DE LUMINY

Président de l'Université d'Aix-Marseille : M. H. GASTAUD

Directeur de l'U.E.R. : M. M. MEBKHOUT

Chef des Services Administratifs : M. M. CONNAT

PROFESSEURS

MM. A. ARAGNOL	Mathématiques
H. BACRY	Physique
M. BIENFAIT	Physique
R. BUVAT	Cytologie et Biologie Végétale
Mme L. CARBONEL	Chimie
MM. J.M. DEBEVER	Physique
G. DUCET	Biologie
D. KASTLER	Physique théorique
H. MOREL	Analyse numérique
J. PAILLARD	Psychophysiologie
A. PENELOUX	Chimie
G. RAUZY	Mathématiques
J. RICARD	Biochimie végétale
D. ROBINSON	Physique
L. SAVIDAN	Chimie systématique
J. SENEZ	Microbiologie
J. STARKA	Microbiologie
Y. THOUVENY	Biologie
G. ZELLER-MEIER	Mathématiques

MAITRES DE CONFERENCES

MM. E. BIANCO	Mathématiques
J. CARMONA	Mathématiques
A. COLMERAUER	Mathématiques
C. FLORES	Psychologie
J. HANUS	Physique
M. MEBKHOUT	Physique
B. MUNIER	Sciences humaines
Mme A. PRELLER-ELLISON	Mathématiques
MM. J.C. RISSET	Arts Plastiques
R. ROSSET	Biologie
G. WEISBUCH	Physique

A ma Mère

A ma Femme

Avant d'aborder l'exposé de nos recherches, nous tenons à exprimer nos sentiments de reconnaissance à tous ceux qui, à des titres divers, nous ont apporté leur aide.

Monsieur le Professeur RICARD, Directeur du Laboratoire de Biochimie Végétale à l'U.E.R. Expérimentale et Pluridisciplinaire de Luminy, dont l'enseignement nous a procuré l'essentiel de nos connaissances en enzymologie et qui a inspiré et dirigé ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

Messieurs les Professeurs LAZDUNSKI et SURZUR qui ont bien voulu, malgré leur travail, faire partie de notre jury et juger nos résultats. Nous les en remercions vivement.

Nous tenons à remercier particulièrement Monsieur NOAT pour avoir bien voulu examiner l'ébauche de ce travail et nous avoir fait part d'avis qui nous ont été très précieux pour sa présentation définitive.

Nous adressons aussi nos vifs remerciements à Monsieur le Professeur DUCET dont les conseils ne nous ont jamais fait défaut.

Nous remercions également Monsieur COCORDANO ainsi que Messieurs BLANC, CAMBE, DI FALCO et REYS sans lesquels les études effectuées à l'aide des calculateurs numériques ou hybrides eussent été impossibles; Messieurs DOU, TORDO, SALMONA, MILLE qui nous ont permis d'effectuer

certaines analyses spectrométriques et aidé dans leur interprétation; Monsieur le Général BUSSON qui nous a accueilli dans son laboratoire et donné la possibilité de faire, en collaboration avec Monsieur COZZONE, les analyses d'amino-acides; Mesdames ACHERY, REFONDINI et RIVIERE qui ont pris une part active et efficace à la réalisation de ce travail; tous nos collègues qui nous ont encouragé ou aidé : Mesdemoiselles BOREL et GOT, Messieurs AUGIER et MONTI.

Nous ne saurions oublier, enfin, Mademoiselle CASSA et Mesdames WOUDSTRA et TESSEIRE pour leur précieuse collaboration à la présentation de ce mémoire.

AVANT PROPOS

Le mécanisme des réactions d'oxydation peroxydative est, à l'heure actuelle, considéré comme bien établi, grâce aux travaux du groupe de CHANCE. Il peut donc sembler paradoxal d'entreprendre à nouveau des études sur un problème qui semble résolu. En fait, comme on le verra dans la suite de ce travail, divers points restent à résoudre pour comprendre le mécanisme des réactions d'oxydation peroxydative. Dans de très nombreux cas, par exemple, on ignore la nature des produits d'oxydation du donneur d'électrons.

Le mécanisme dit de "THEORELL - CHANCE", qui implique l'existence d'un échange électronique entre le donneur d'électrons et les "composés" de la peroxydase, sans formation de complexe ternaire, semble une simplification trop poussée de la réalité. L'idée selon laquelle toutes ces réactions d'oxydation peroxydative impliqueraient une augmentation de un du niveau d'oxydation du donneur n'a pas encore été établie de manière indiscutable.

De plus, la possibilité de formation de complexes binaires abortifs entre les peroxydases et les donneurs d'électrons n'a pas été examinée de manière approfondie.

Enfin, la plupart des recherches réalisées jusqu'à ce jour sur le mécanisme des réactions d'oxydation peroxydative ont été réalisées sur des mélanges d'isoperoxydases.

Toutes ces raisons nous ont poussé à entreprendre à nouveau l'étude du mécanisme de deux réactions d'oxydation peroxydative : l'oxydation peroxydative du gaïacol et l'oxydation peroxydative du ferrocyclochrome c catalysées par une peroxydase de raifort.

S O M M A I R E

— — — — —

CHAPITRE I. LA PEROXYDASE DE RAIFORT	1
I . <u>Mise en évidence et propriétés physico- chimiques des isoperoxydases de raifort</u>	1
1) . Mise en évidence des isoperoxydases de raifort	1
2) . Structure et propriétés physico- chimiques des peroxydases de raifort	2
II . <u>Connaissances actuelles sur le mécanisme de l'oxydation des donneurs d'électrons par les peroxydases</u>	15
1) . Mécanisme général	16
2) . Oxydation du gaïacol	19
A . Nature du produit de l'oxydation du gaïacol par différents agents	19
B . Mécanismes possibles de l'oxydation du gaïacol par les peroxydases	25
3) . Oxydation du ferrocytochrome c	30
A . Oxydation du ferrocytochrome c par différents agents	30
B . Mécanismes possibles de l'oxydation du ferrocytochrome c par les peroxydases	33

CHAPITRE II. METHODES D'ETUDE	43
I . <u>Chromatographie et tamisage moléculaire</u>	43
1) . Chromatographie et tamisage moléculaire sur gel de Sephadex	43
2) . Chromatographie sur résine Amberlite	43
3) . Chromatographie sur couche mince de silice	44
II . <u>Electrophorèses sur acétate de cellulose</u>	45
III . <u>Dosage de l'hématine</u>	45
IV . <u>Estimation de la concentration et du degré de pureté des différents réactifs utilisés</u>	45
1) . Isoperoxydase P ₂ de raifort	45
2) . Gaïacol	46
3) . Eau oxygénée	46
4) . Cytochrome c	47
V . <u>Composition en amino-acide de l'isoperoxydase P₂ de raifort</u>	48
VI . <u>Détermination de la masse moléculaire et de la constante de sédimentation de l'isoperoxy- dase P₂ de raifort</u>	49
VII . Spectrométrie	50
1) . Spectrophotométrie dans le visible et l'ultra-violet	50
A . Spectres	50
B . Cinétiques : mesure de la vitesse de réaction	51

2) . Spectrophotométrie dans l'infra- rouge	52
3) . Spectrométrie de masse	53
4) . Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire	53
VIII . <u>Calcul hybride</u>	53
IX . <u>Interprétation des courbes théoriques de titrage par l'eau oxygénée d'un donneur d'électrons</u>	54
1) . Le donneur d'électrons peut échanger un électron (N=1)	54
A . Le produit d'oxydation P est un monomère du donneur d'électrons oxydé : $P = AH$	54
B . Le produit d'oxydation P est un dimère du donneur d'électrons oxydé : $P = A_2 H_2$	57
C . Le produit d'oxydation P est un tétramère du donneur d'électrons oxydé : $P = A_4 H_4$	59
2) . Le donneur d'électrons peut échanger deux électrons (N=2)	60
A . Le produit d'oxydation P est un monomère du donneur d'électrons oxydé : $P = A$	60
B . Le produit d'oxydation P est un dimère du donneur d'électrons oxydé : $P = A_2$	62

C . Le produit d'oxydation P est un tétramère du donneur d'électrons oxydé : $P = A_4$	63
CHAPITRE III. ISOLEMENT, PURIFICATION ET CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'ISOPEROXYDASE P_2 DE RAIFORT	
I . <u>Isolement et purification</u>	66
1) . Composants de la préparation commerciale	66
2) . Séparation des peroxydases acides et basiques	66
3) . Séparation des peroxydases P_1 et P_2	69
4) . Purification ultérieure de la peroxydase P_2 par tamisage moléculaire	69
5) . Conclusions	71
II . <u>Caractéristiques physico-chimiques de l'isoperoxydase P_2</u>	73
1) . Vitesse de migration électrophorétique ..	73
2) . Caractéristiques hydrodynamiques	73
A . Constante de sédimentation	73
B . Masse moléculaire	73
3) . Composition en amino-acides	78
4) . Caractéristiques spectrales	81
CHAPITRE IV. ETUDE DE L'OXYDATION DU GAIACOL PAR L'ISOPEROXYDASE P_2 DE RAIFORT.....	
I . <u>Etude du produit d'oxydation</u>	85

1) . Préparation du produit d'oxydation du gaïacol	85
A . Préparation à la lumière du produit d'oxydation à l'état solide	85
B . Préparation à l'obscurité et en solu- tion dans un solvant organique, du produit d'oxydation	86
C . Test d'homogénéité du produit : chromatographie sur couche mince	87
2) . Courbe de titrage du gaïacol par l'eau oxygénée en présence de l'isoperoxydase P ₂ de raifort	88
3) . Spectrophotométrie dans le visible et dans l'ultra-violet	90
A . Spectres absolus	90
B . Spectres de différence	93
C . Cinétique de formation et de décomposition du produit d'oxyda- tion du gaïacol à l'obscurité	96
4) . Spectrophotométrie dans l'infra- rouge	99
A . Spectre IR du gaïacol	99
B . Spectre IR du produit d'oxydation du gaïacol $\mathcal{P}$ préparé à l'obscurité	102
C . Spectre IR du produit d'oxydation du gaïacol préparé à la lumière	103
5) . Spectrométrie de R.M.N	103
6) . Spectrométrie de masse	105

II .	<u>Mécanisme possible de l'oxydation</u>	105
1) .	Formation d'un bi-radical	108
2) .	Transformation et réactions secondaires du bi-radical conduisant au produit $\mathcal{J}$	110
3) .	Obtention des produits mis en évidence par BOOTH et SAUNDERS	114
III .	<u>Localisation des étapes enzymatiques de la réaction dans le modèle général</u>	115
1) .	Réaction de formation du produit $\mathcal{J}$	115
2) .	Réaction de formation du produit P_G	115
3) .	Réaction de formation du produit P_L	116
4) .	Conclusions.....	118
IV .	<u>Etude de l'étape enzymatique de la réaction</u> ..	121
1) .	Mise en évidence de la formation d'un complexe entre le galacol et la peroxydase	121
2) .	Cinétique à l'état stationnaire	125
A .	Mécanisme réactionnel enzymatique	125
B .	Résultats expérimentaux	133
CHAPITRE V.	ETUDE DE L'OXYDATION DU FERROCYTOCHROME C CATALYSEE PAR L'ISOPEROXYDASE P_2 DE RAIFORT	153
I .	<u>Préparation du substrat "ferrocytochrome c"</u> ...	153
1) .	Purification du cytochrome c	153
2) .	Réduction du cytochrome c purifié	154

II . <u>Courbe de titrage du ferrocytochrome c</u> <u>par l'eau oxygénée en présence de</u> <u>l'isoperoxydase P₂ de raifort</u>	156
III . <u>Etude cinétique de la réaction d'oxydation</u> <u>du ferrocytochrome c par l'isoperoxydase</u> <u>P₂ de raifort</u>	159
1) . Etude spectrophotométrique	159
2) . Vérification du modèle réactionnel proposé par une simulation en calcul hybride analogique-numérique	170
<u>Résumé et conclusions générales</u>	180
<u>Bibliographie</u>	183

CHAPITRE I

LA PEROXYDASE DE RAIFORT.

Les peroxydases de raifort ont fait l'objet de nombreux travaux qui ont permis, d'une part, d'établir l'existence de plusieurs isoenzymes dans les cellules végétales et, d'autre part, d'établir des modèles susceptibles d'expliquer leur mécanisme d'action. Nous évoquerons successivement ces deux catégories de résultats.

I. Mise en évidence et propriétés physico-chimiques des isoperoxydases de raifort*

1) Mise en évidence des isoperoxydases de raifort.

Les préparations de peroxydase (HRP)** de raifort renferment en fait plusieurs isoenzymes différents.

C'est THEORELL (3) qui constata le premier, en 1942, l'existence de deux formes principales de peroxydase dans le raifort. Il les appela peroxydase "normale" (ou HRP II) et "paraperoxydase" (ou HRP I). La notion d'isoperoxydase était née. Elle ne fut cependant acceptée définitivement qu'en 1952 quand JERMYN (4) mit en évidence, par chromatographie sur papier, quatre composants dans HRP. Deux années plus tard THOMAS (5) décelait

* Une partie importante des informations contenues dans ce chapitre peut être trouvée dans la revue générale de SAUNDERS et Coll. (1) et dans la thèse de Doctorat d'Etat de J. NARI (2).

** Abréviation de Horseradish Peroxydase (E.C-1-11-1-7)

un cinquième composant par électrophorèse sur papier. De nombreux résultats permettent aujourd'hui d'affirmer, sur des bases physico-chimiques précises, que les isoperoxydases existent réellement. Leur nombre, par contre, est connu avec moins de certitude. Il oscille entre quatre (4) et vingt (6) selon les auteurs (tableau I , page 3).

Les techniques d'électrofocalisation (6) ont permis de mettre en évidence environ 20 isoperoxydases. Il est probable que certaines d'entre-elles correspondent à des artéfacts.

2) Structure et propriétés physico-chimiques des peroxydases de raifort

Les peroxydases de raifort sont des hémoprotéines (figure 1 , page 4) dont le groupement prosthétique, la protohématine IX (figure 2 , page 5), est lié à l'apoenzyme (glucoprotéine) par l'intermédiaire de l'atome de fer hématinique. Ce dernier a six positions de coordination dont quatre sont liées aux atomes d'azote porphyriniques, la cinquième à la protéine, et la sixième à une molécule d'eau. C'est par échange du groupement de cette sixième position que la peroxydase réagirait dans les réactions d'oxydation.

Le groupement prosthétique confère à la molécule une absorbance dans le visible (figure 3 , page 6). Parmi les trois bandes observées (désignées par α , β , γ), caractéristiques des porphyrines métalliques, la plus intense se situe dans la région de Soret aux environs de 400 nm. Une absorbance dans l'ultra-violet (aux environs de 280 nm) due à l'apoprotéine est également observable.

La charge nette de l'atome de fer hématinique

Source	Méthode de purification	nombre de peroxydases		référence
		isolées	mises en évidence	
Raifort (racines)	Pr + El	2	2	3
	Pr	1	1	10
	Chr		4	4
	Pr	1	1	11
	El		5	9
	Pr + Chr	4	4	12
	Pr + Chr	4	4	13
	Pr + Chr	7	7	9
			20	6
Raifort (préparation commerciale)	El	4	11	8
	Pr + Chr	5	5	7

TABLEAU I

Mise en évidence et purification des isoperoxydase de raifort

Abréviations : El : électrophorèse ; Chr : Chromatographie ;
Pr : Précipitation.

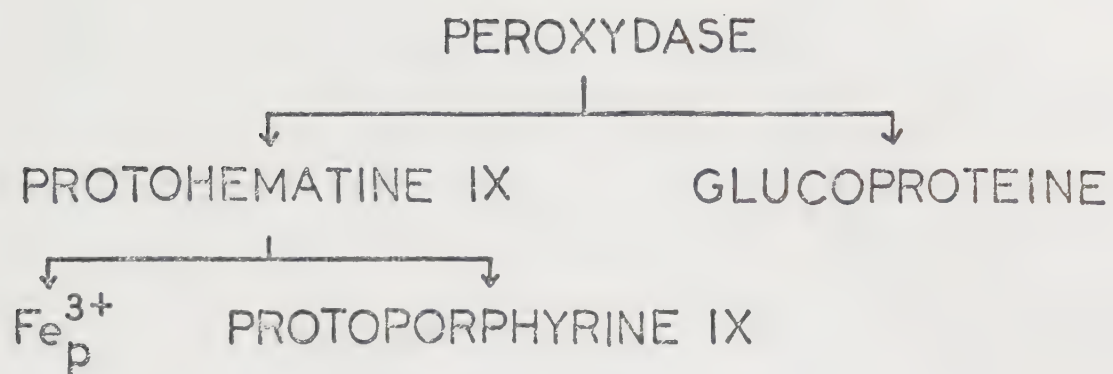


Figure 1

Structure de la peroxydase

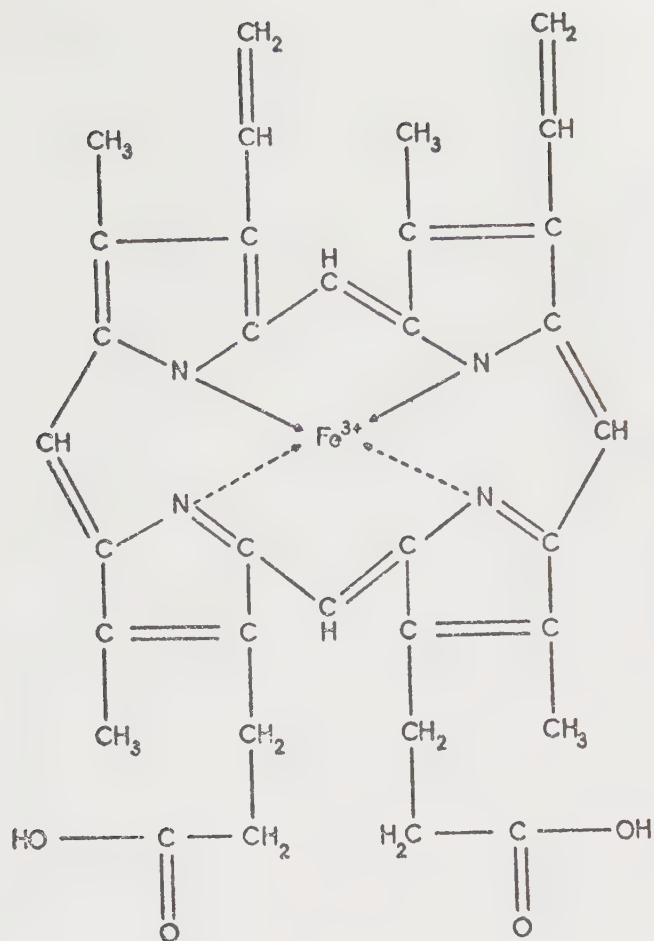


Figure 2

Structure de la protohématine IX

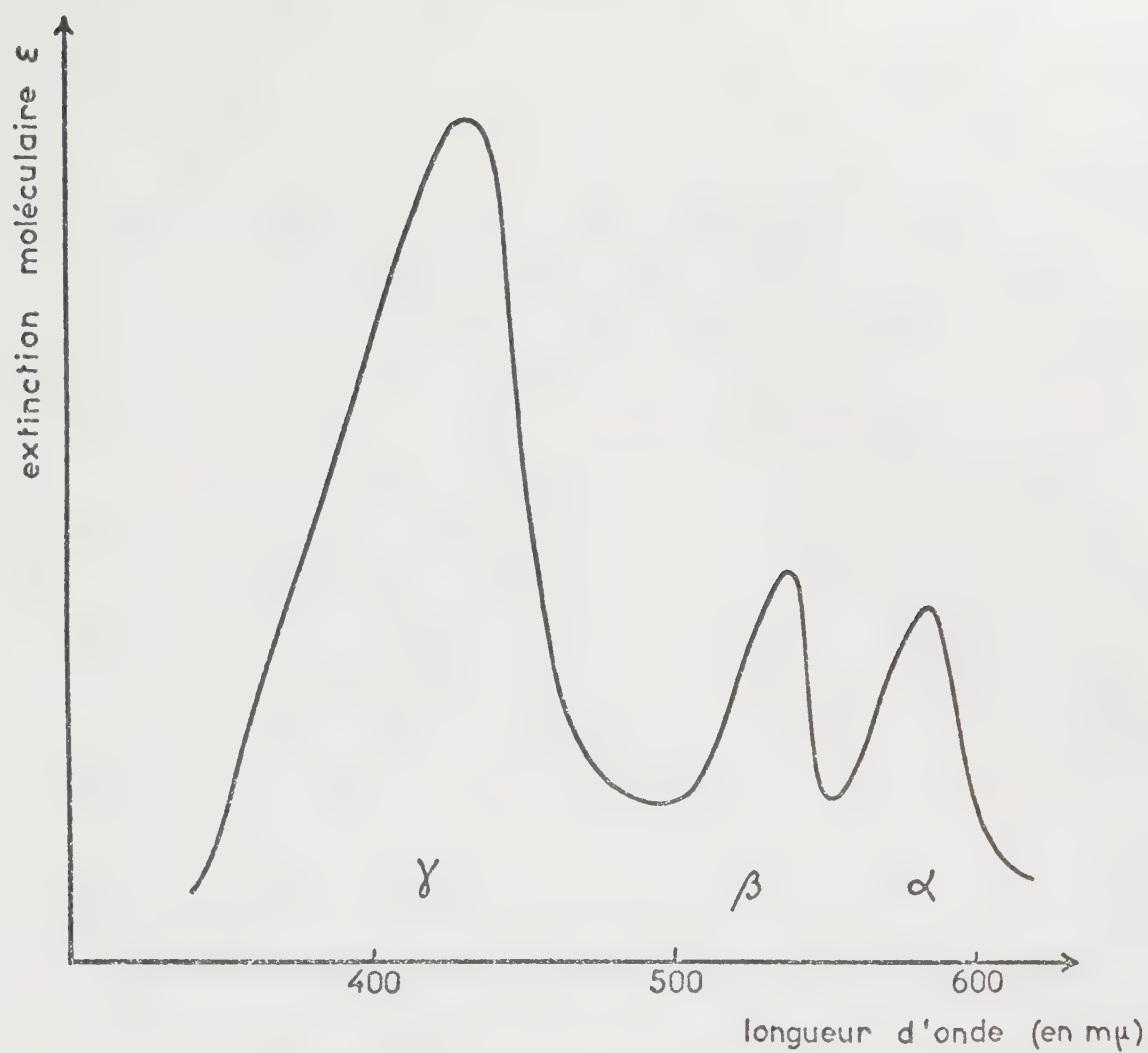


Figure 3

Spectre d'absorption des porphyrines métalliques
(protohématines).

dans l'enzyme à l'état oxydé (ferriperoxydase) est de trois. L'enzyme oxydé peut être réduit sous forme de ferroperoxydase par des agents réducteurs énergiques et la charge nette de l'atome de fer prend alors la valeur de deux.

Il est bien établi que la ferriperoxydase peut être rapidement convertie, par addition d'une quantité stoechiométrique d'eau oxygénée (ou de peroxyde) en un composé vert (14) appelé composé I^{*}; celui-ci, une fois formé, se transforme en un composé rouge (15) appelé composé II^{**}, qui, à son tour, se décompose graduellement en régénérant la ferriperoxydase. En présence d'un très gros excès d'eau oxygénée (ou de peroxyde), un troisième type de composé, rouge, appelé composé III, peut également se former. Les caractéristiques spectrales de la ferriperoxydase et des composés I, II et III sont représentées dans la figure 4, page 8. Les méthodes d'écoulement (16) ont permis à CHANCE (17, 18) de montrer que l'action d'un peroxyde donne très rapidement le composé I, puis lentement le composé II. CHANCE (19) a pu observer que la transition du composé I au composé II était considérablement accélérée en présence d'agents réducteurs. Les titrages réductifs du composé II (21, 22, 23) et du composé I (24, 20) ont permis de montrer que le composé I possède les deux équivalents oxydants présents dans la molécule de peroxyde, tandis que le composé II n'en possède qu'un. La transition composé I $\longrightarrow$ composé II s'effectue donc par réduction d'un équivalent avec un donneur d'électrons, de même que la

* abréviation CoI ou ES_I suivant les auteurs.

** abréviation CoII ou ES_{II} suivant les auteurs.

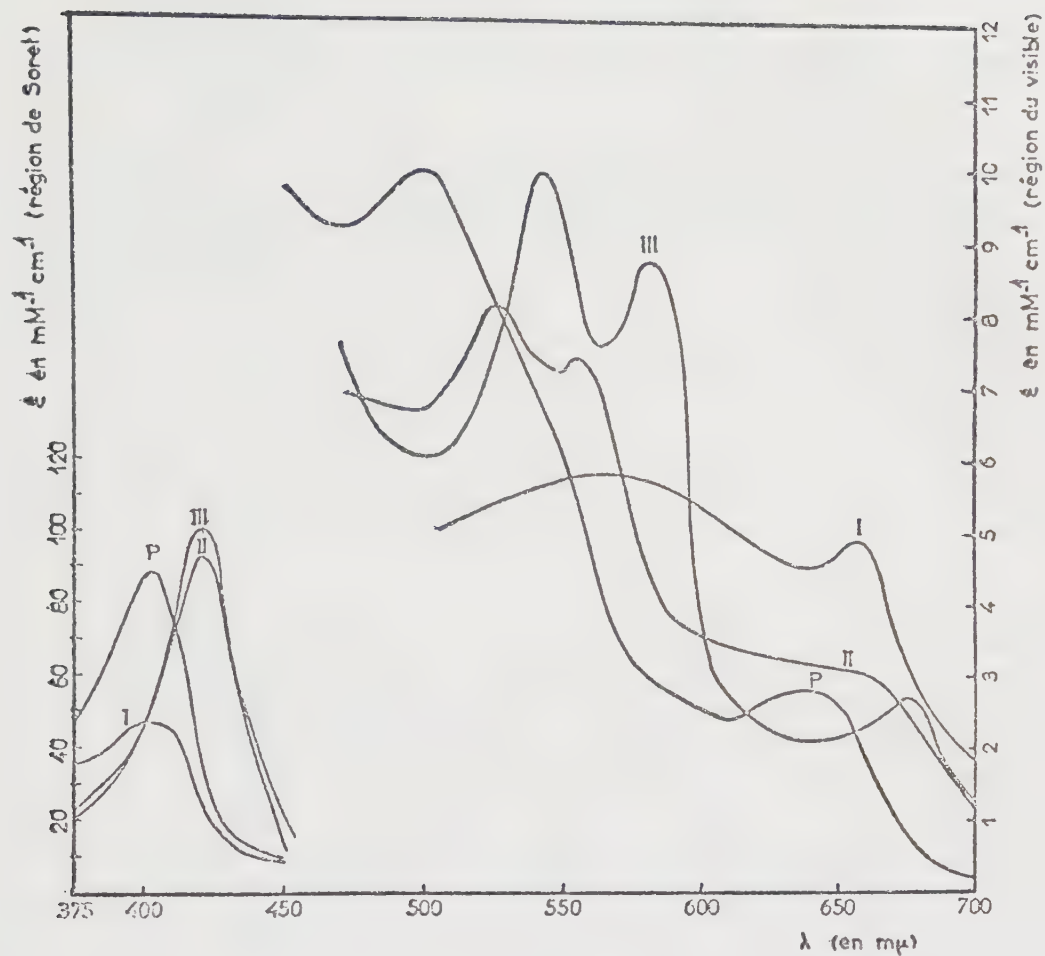


Figure 4

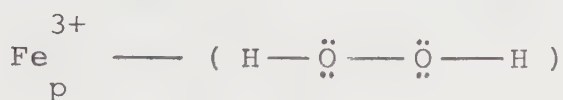
Spectres de la ferriperoxydase (P) et de ses trois composés (I, II, III).

A gauche, spectres enregistrés dans la région de Soret (d'après CHANCE (20) et KEILIN et HARTREE (10)).

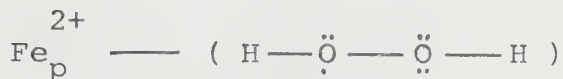
A droite, spectres enregistrés dans le visible d'après CHANCE (20) et KEILIN et HARTREE (10)).

régénération de la ferriperoxydase à partir du composé II. L'ensemble de ces résultats est schématisé dans la figure 5 (page 10).

Il est généralement admis que la structure du composé I correspond à un complexe peroxydase-peroxyde



ou



D'après GEORGE (21,22), il existerait quatre structures possibles pour le composé II (figure 6, page 11) :

- dans le Schéma I, le fer est simplement tétravalent,
 Fe_p^{4+} ou $\text{Fe}_p^{3+} \text{ — } (\cdot \text{OH})$;
- le schéma II correspond à une structure biradicalaire dans laquelle le fer trivalent forme une extrémité du radical, l'autre étant par exemple le radical $\text{—CH}_2^\cdot$;
- le schéma III correspond à un niveau d'oxydation plus élevé du groupement hématinique dans lequel un électron a été "extraît" du système conjugué d'électrons ;
- dans le schéma IV le composé II est sous la forme d'un "ion ferryl" $\text{Fe}_p^{2+} \text{ — } \cdot \ddot{\text{O}} \cdot$ ou $\text{Fe}_p^{4+} \text{ — } \ddot{\text{O}} \cdot (=)$ en résonance avec la forme ferrique, suivant la réaction :

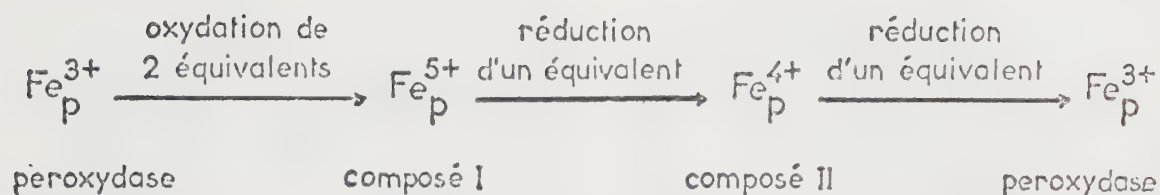


Figure 5

Niveaux d'oxydation de la peroxydase au cours des réactions d'oxydation peroxydative.

Dans ce schéma $\text{Fe}_{\text{p}}^{3+}$, $\text{Fe}_{\text{p}}^{5+}$, $\text{Fe}_{\text{p}}^{4+}$ représentent les niveaux d'oxydation de la peroxydase.

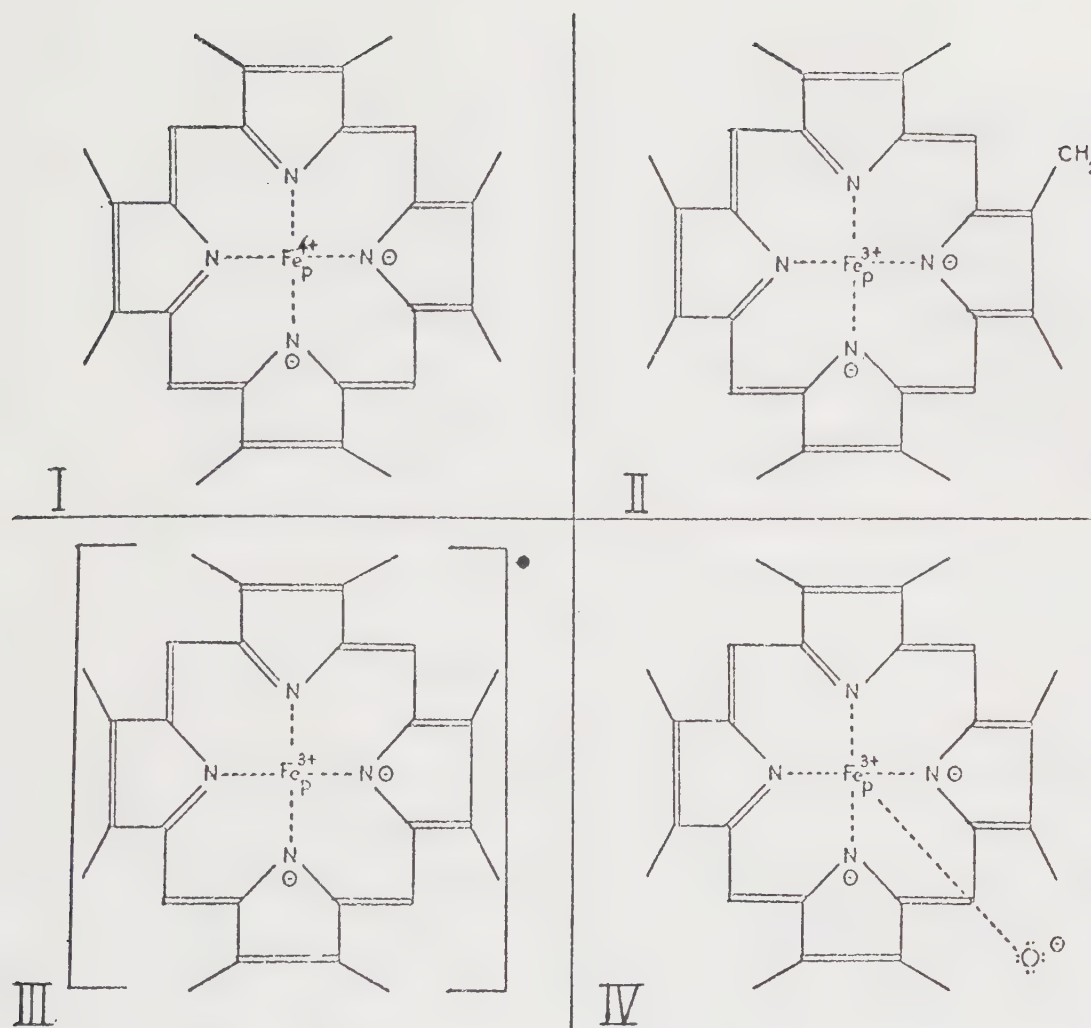


Figure 6

Différentes structures proposées pour le composé II.



La masse moléculaire des peroxydases de raifort, variable selon l'isoenzyme considéré, est voisine de 40 000. THEORELL (25) en effectua la première détermination en 1942, d'après le contenu hématinique de l'enzyme, et par ultracentrifugation analytique. Il obtint les valeurs de 44 100 pour la masse moléculaire et 3,85 pour la constante de sédimentation $S_{20,w}^0$. Ces résultats sont en bon accord avec ceux de CECIL et OGSTON (26), de MAEHLY (27), et de SHANNON et coll (9).

La technique de tamisage moléculaire (28) et l'analyse de la composition en amino-acides et en sucres (29) ont également confirmé ces résultats.

La composition en amino-acides de la protéine enzymatique fut effectuée pour la première fois en 1942 par THEORELL et AKESSON (30) qui trouvèrent deux molécules d'histidine, dix huit d'arginine et douze de lysine par molécule de HRP, ainsi qu'une grande quantité de sucres. En 1950, MAEHLY et PALEUS (31) signalèrent que HRP contenait les 20 amino-acides présents dans les protéines, à l'exception du tryptophane et de l'hydroxyproline. L'absence d'hydroxyproline dans HRP a été confirmée en 1965 par KLAPPER et HACKETT (8). Sa présence a cependant été montrée par MORITA et KAMEDA (32) dans la peroxydase de radis japonais "JRP a" et par LIU et LAMPORT (33) dans l'isoperoxydase de raifort la plus acide. Ces derniers auteurs ont en effet caractérisé une liaison sucre - peptide de type O - glycosidique entre l'hydroxyproline et l'arabinose. D'autre part, en trouvant dans le composant majeur de préparations de HRP, un résidu de tryptophane,

WELINDER et SMILLIE (34 - 35) sont en contradiction avec MAEHLY et PALEUS (31) qui ont signalé son absence. WELINDER et Coll. (35) ont, de plus, établi les séquences complètes de 21 peptides tryptiques du composant majeur de HRP et rendu compte, ainsi, de 203 des quelques 300 résidus d'acides-amino de la protéine. Ils ont montré que les 8 résidus d'acide cystéique correspondent à 4 ponts disulfures et confirmé leurs résultats en étudiant la séquence de 120 peptides thermolytiques (34). Dans le tableau II (page 14) sont rassemblés les résultats comparés des analyses en acides-amino effectuées par différents chercheurs.

Des mesures de dichroïsme circulaire et de dispersion optique rotatoire ont permis à STICKLAND et Coll. (36 - 37) et à WEINRYB (38) d'évaluer le contenu en α -hélice de HRP, respectivement à 30-40% et à 23 %.

Le contenu en sucres de la peroxydase est estimé à 18%. (8 - 9) mais ce résultat est incertain car le procédé de séparation de l'hème peut influencer sur les résultats obtenus dans l'analyse des chaînes latérales glucidiques (34).

Le mode de liaison sucre-peptide des diverses isoperoxydases est assez mal connu. Hormis les travaux de LIU et LAMPORT (33) déjà cités, signalons ceux, plus récents, de WELINDER et SMILLIE (34). Ces auteurs ont reconnu huit sites de liaison glucidique dont sept seraient reliés à l'asparagine. Pour six d'entre eux, la liaison glucide-asparagine se situerait dans les séquences bien connues (40) : Asn - X - Ser ou Asn - X - Thrn (X étant l'un des résidus d'acides-amino suivants : Ala, Phe, Thr, Arg, Ser, Asn).

	Résidus par mole			
	HRP N° III ^a KLAPPER et Coll. (8)	Isoenzyme C ^a SHANNON et Coll. (9)	HRP ^a Worthington BRILL et Coll. (39)	HRP MANN WELINDER et Coll. (35)
Lysine	6	6	6	5,8
Histidine	3	3	3	2,9
Arginine	21	21	18	19,7
Ac .aspartique	51	50	48	46,5
Thréonine	25	23	24	25,3 ^b
Sérine	23	22	24	25,7
Ac. Glutanique	21	19	20	19,9
Proline	17	6	19	17,1
Glycine	17	15	18	17,0
Alanine	24	23	23	23,0
Demi-Cystine	-	4	6 (8)	7,9 (7,8) ^{c,d}
Valine	16	17	16	17,6
Méthionine	3	3	3	4,2 (3,3) ^c
Isoleucine	12	13	12	12,3 ^e
Leucine	36	36	31	35,0
Tyrosine	5	5	5	5,9
Phénylalanine	20	23	18	20,2
Glucosamine				9,7 ^f

Tableau II

Comparaison des analyses en amino-acides, effectuées par
différents chercheurs sur une peroxydase de Raifort.

Tableau II (suite)

- a - La composition en amino-acides prise dans la littérature a été recalculée par WELINDER et Coll. (35) en supposant un poids moléculaire de la fraction protéique de HRP de 32 000 à 33 000 ou un nombre de résidus d'amino-acides par mole de HRP de 300.
- b - Extrapolation à un temps zéro d'hydrolyse.
- c - Les valeurs de l'acide cystéique et de la méthionine sulfone sont des moyennes obtenues à partir de quatre hydrolysats de HRP oxydée par l'acide performique.
- d - Valeurs corrigées de celles obtenues par des témoins (HRP non oxydée).
- e - Valeur obtenue pour un temps d'hydrolyse de soixante douze heures.
- f - Cette valeur obtenue pour un temps d'hydrolyse de vingt heures est incorrecte. Soixante douze heures d'hydrolyse entraînent la destruction complète de GlcN.

La nature de la liaison Hème - Protéine est également mal connue. BRILL et WILLIAMS (41) ont supposé que la HRP II était un complexe amino (5ème position de coordination du fer hématinique) - carboxyle ou H_2O (6ème position de coordination du fer hématinique). Les travaux de RICARD et MAZZA (42) ont permis de postuler la présence, dans la peroxydase P_1 de navet, d'un résidu d'histidine en cinquième position de coordination du fer. L'analogie établie par ces auteurs entre la peroxydase P_1 et la HRP II semble donc confirmer l'hypothèse de BRILL et WILLIAMS. La participation de l'histidine dans la liaison hémato-protéique a été également confirmée par SHIH et Coll. (43) sur les isoperoxydases A_1 et C de raifort. GEORGE et LYSTER (44), enfin, ont émis l'idée, contestée par NICHOLLS (45), selon laquelle l'hématine se trouverait dans une crevasse de la protéine.

II. Connaissances actuelles sur le mécanisme de l'oxydation des donneurs d'électrons par les peroxydases.

Comme nous l'avons mentionné antérieurement, les peroxydases sont susceptibles, en présence de peroxyde, d'oxyder de très nombreux donneurs d'électrons. Bien que, comme nous le verrons plus loin, les processus d'oxydation de ces différents donneurs ne soient pas identiques, on peut toujours les rattacher à un schéma réactionnel de base commun. Ce modèle "fondamental", qui fait intervenir les composés I et II de la peroxydase, a été élaboré essentiellement par le groupe de CHANCE. Nous en donnerons d'abord la description. Ensuite, dans le cadre de ce mécanisme de base, nous examinerons en détail les particularités de l'oxydation des donneurs d'électrons qui ont fait l'objet de notre étude.

1) Mécanisme général.

L'oxydation de nombreux donneurs d'électrons peut être catalysée par les peroxydases. On peut alors observer des relations hyperboliques entre la vitesse initiale de la réaction et la concentration en donneur. Pour rendre compte de ce caractère hyperbolique plusieurs hypothèses ont successivement été faites.

- MANN (46) supposa d'abord la formation d'un "complexe ternaire limitant" entre la peroxydase, l'eau oxygénée et le donneur, ainsi que le montre le mécanisme représenté dans la figure 7 A (page 17).

- Ultérieurement CHANCE (47) fit remarquer que ce caractère hyperbolique pouvait s'expliquer sans qu'il fut nécessaire de supposer la formation d'un complexe ternaire (figure 7 B, page 17).

- Le titrage réductif du composé II par GEORGE (21, 22, 23), et du composé I par CHANCE (20 , 24), permit alors à ce dernier auteur (48 , 49) de proposer un nouveau mécanisme de l'oxydation des donneurs d'électrons (figure 7 C, page 17) qui tenait compte à la fois du caractère hyperbolique des courbes de vitesse, noté antérieurement par MANN (46), et aussi des niveaux d'oxydation différents de la ferriperoxydase et des composés I et II.

Ce dernier mécanisme était très satisfaisant car il tenait compte de l'ensemble des connaissances de l'époque relatives à la peroxydase. En particulier il attribuait un rôle précis aux composés I et II dans la catalyse.

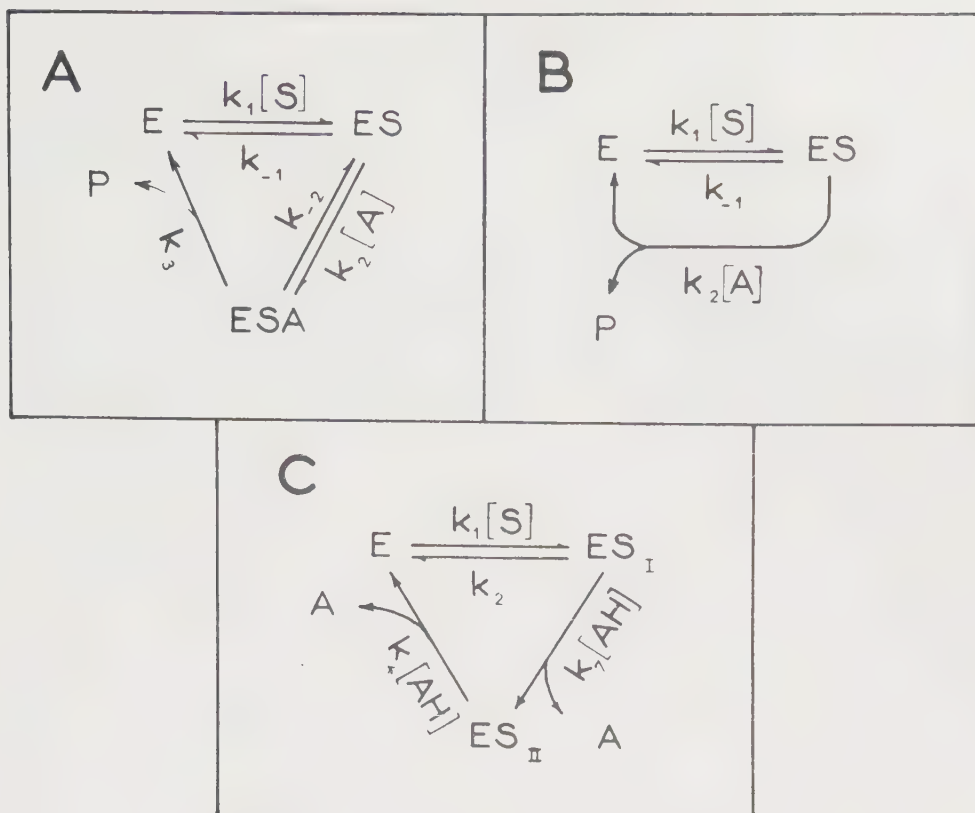


Figure 7

Différents mécanismes proposés susceptibles d'expliquer l'oxydation des donneurs d'électrons catalysée par la peroxydase de Raifort.

- A. Mécanisme proposé par MANN (46)
- B. Mécanisme proposé par CHANCE (47)
- C. Mécanisme proposé par CHANCE (48, 49)

Dans ces mécanismes, E représente la peroxydase, S l'eau oxygénée.

Dans les schémas A et B, le donneur d'électrons est représenté par A sous sa forme réduite et par P sous sa forme oxydée; ES représente un complexe enzyme-eau oxygénée et ESA un complexe enzyme-eau oxygénée-donneur.

Figure 7 (suite).

Dans le schéma C, le donneur d'électrons est représenté par AH sous sa forme réduite et par A sous sa forme oxydée; ES_I et ES_{II} représentent les composés I et II.

Il est cependant très important, pour la suite de cet exposé, de souligner que dans ce mécanisme, CHANCE et Coll. (48 - 49) excluent l'existence d'un complexe ternaire formé entre l'enzyme, l'eau oxygénée et le donneur d'électrons. Il en résulte, d'après CHANCE et MAEHLY (50), que l'inverse de la vitesse* à l'état stationnaire ne contient aucun terme indépendant des concentrations en substrats soit :

$$\frac{[E]_0}{v} = \frac{1}{k_1 [S]} + \frac{1}{k_4 [AH]} \quad (1)$$

Cette prédiction du modèle de CHANCE n'est, en fait, pas observée avec les donneurs d'électrons habituels. Il y a donc là une lacune sur laquelle nous reviendrons, dans le paragraphe suivant, à propos de l'oxydation du gaïacol.

* Plus exactement, l'équation devrait s'écrire, bien que cela ne fut pas explicitement mentionné par CHANCE et MAEHLY :

$$\frac{[E]_0}{v} = \frac{1}{k_1 [S]} + \left(\frac{1}{k_4} + \frac{1}{k_7} \right) \times \frac{1}{[AH]} + \frac{k_2}{k_1 k_7} \times \frac{1}{[AH][S]}$$

Cependant, cette dernière équation se réduit à l'équation [1] car $k_7 \gg k_4$ (du fait que le composé I est limitant)

et $\frac{k_2}{k_1 k_7} \times \frac{1}{[AH][S]}$ est négligeable dans les conditions expérimentales.

Le modèle suppose d'autre part que le donneur d'électrons ne peut céder qu'un seul électron par molécule au cours de son oxydation. Or, nombreux sont les exemples de donneurs d'électrons pouvant en céder plus. Il est donc essentiel, avant de postuler un modèle réactionnel, de déterminer le nombre d'électrons cédés par le donneur. Dans la suite de notre étude, en particulier dans le cas du gaïacol, nous essaierons donc de répondre à cette question avant d'aborder l'étude cinétique proprement dite.

La dernière remarque critique que l'on peut faire sur ce modèle est qu'il ne rend pas compte de la possibilité de formation d'un complexe binaire inactif entre l'enzyme et certains donneurs d'électrons.

2) Oxydation du gaïacol.

Le gaïacol (ou orthométhoxyphénol) a été l'un des donneurs d'électrons le plus utilisé. Il a été également très employé par les chimistes organiciens pour l'étude des réactions d'oxydation des composés phénoliques.

A. Nature du produit de l'oxydation du gaïacol par différents agents.

Dès 1916, BACH et CHODAT (51) notèrent que le gaïacol était oxydé par les systèmes peroxydasiques en une substance rouge. MANN (52) utilisa ensuite cette réaction dans ses investigations sur la cinétique des réactions catalysées par la peroxydase. UCKO et BANSI (53) situèrent le pH optimal de la réaction au voisinage de 5 - 5,2 tandis que CHANCE (19) montra que la vitesse de réaction du "complexe I" avec le gaïacol était peu affectée par le pH dans la région 3,4 - 5,3.

La nature du produit d'oxydation du gaïacol

fit l'objet de nombreux travaux . En 1903, BERTRAND (54, 55, 56) oxyda le gaïacol avec l'enzyme appelé laccase et obtint une "tétragaiïacoquinone" rouge qu'il identifia à un peroxyde (figure 8 A , page 21). D'après BOOTH et SAUNDERS (57), cette structure était improbable, car elle ne rendait pas compte de la coloration du produit. Ils pensaient, pour leur part, que le précipité obtenu avec la peroxydase contenait essentiellement le 2:2'-dihydroxy-3:3'-diméthoxy-diphényl (figure 8 B, page 21) qu'ils pouvaient extraire du précipité par sublimation sous vide.

L'action des agents oxydants non enzymatiques retint aussi l'attention des chercheurs. En 1937 KAR (58) mentionna l'oxydation du gaïacol en "tétragaiïacoquinone" par l'eau oxygénée et des quantités catalytiques de solutions d'acides tungstique, molybdique et vanadique. Par oxydation électrochimique du gaïacol dans l'acide sulfurique, FICHTER et DIETRICH (59) isolèrent le 4:4'-dihydroxy-3:3'-diméthoxy-diphényl (figure 8 C , page 21). TEUBER et JELLINCK (60) obtinrent la méthoxy-p-benzoquinone avec le nitrodisulfonate de potassium, de même que WESSELY et KOLTAN (61) avec le tétra-acétate soluble et TEUBER et RAU (62) avec le sel de FREMY. Lorsqu'un substituant en para était présent, ces derniers oxydants donnaient une 3-méthoxy-o-quinone.

En 1968, ROY et SWAN (63), sous l'action du peroxyde de benzoyle, obtinrent le même produit d'oxydation que BOOTH et SAUNDERS (57) (mais avec un très faible rendement) dans le benzène à 45°, ou l'o-benzoyloxy-anisole dans le cumène à 0°.

Le periodate a été l'un des agents oxydants le plus utilisé . PENNINGTON et RITTER (64) montrèrent

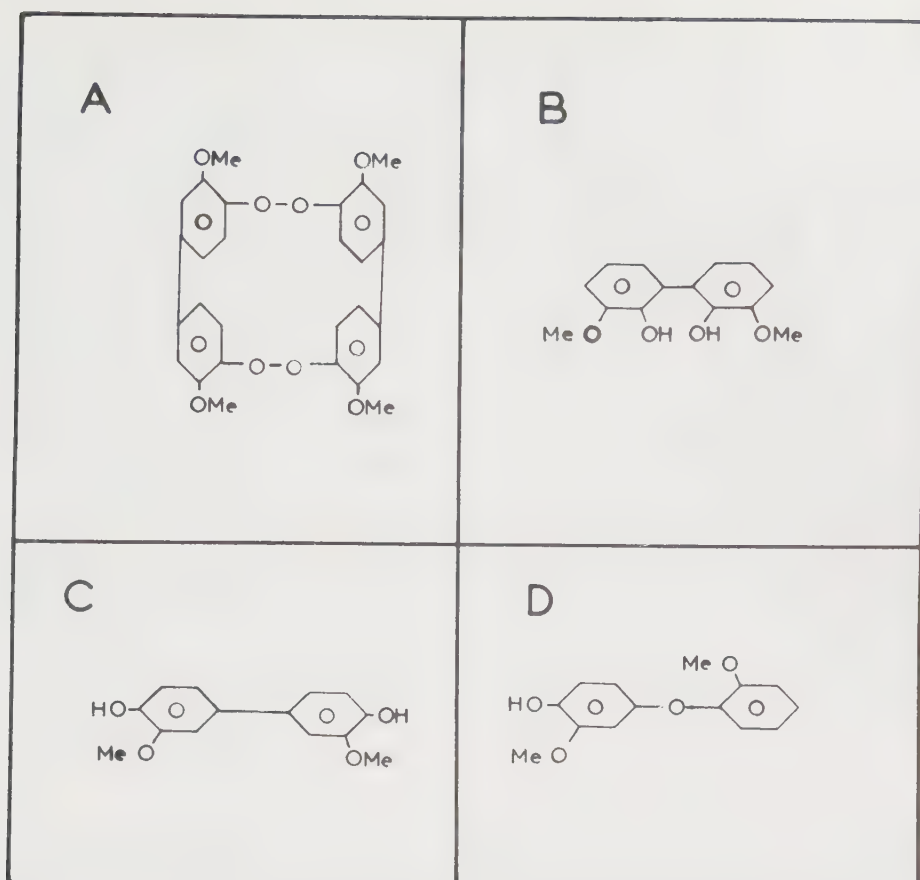


Figure 8

Formules du produit d'oxydation du gaïacol proposées
par différents chercheurs.

- A. Tétragaïacol (54, 55, 56)
- B. 2:2'-dihydroxy-3:3'-diméthoxydiphényl (57)
- C. 4:4'-dihydroxy-3:3'-diméthoxydiphényl (59)
- D. 4-hydroxy-2':3-diméthoxydiphényl éther (76, 77, 78).

en 1947, qu'une molécule de gaïacol réagissait avec trois molécules de periodate avec formation d'une couleur rouge. STUMPF et RUMPF (65) employèrent également le gaïacol et attribuèrent la coloration à des produits quinoniques. FEIFER, SMITH et WILLEFORD (66) pensèrent que l'oxydation pouvait procéder par une cétonisation. D'après ADLER et MAGNUSSON (67), selon les conditions de la réaction, 64% d'o-benzoquinone, 56% de pyrocatechol ou 45% du dimère de l'o-benzoquinone pouvaient être obtenus. L'oxydation avec déméthylation du gaïacol par le periodate permit à ADLER, FALKENHAG et SMITH (68) d'obtenir 90% d'o-benzoquinone (l'ester aryl periodate était, selon ces auteurs, converti directement, ou par l'intermédiaire de son cation aroxyl, en semi-quinone qui se décomposait ensuite en quinone).

Les accepteurs tels le persulfate (69), l'acide nitrique (70), l'acide peracétique (71), NaClO_2 (72), ClO_2 (72 - 73) furent également utilisés, de même que l'oxydation électrochimique (74). Dans tous les cas des composés quinoniques furent obtenus.

En 1960, GIANOLA et MEYBECK (72) ont remarqué que les produits d'oxydation réagissaient avec les solutions alcalines et se décomposaient en produits acides dont l'acide oxalique. Dès 1954, l'action de la soude sur le produit d'oxydation du gaïacol était déjà remarquée par JERMYN et THOMAS (75); ces derniers proposaient d'ajouter de la soude dans le milieu réactionnel pour stabiliser le produit rouge formé servant de mesure à l'activité de la peroxydase.

Les travaux les plus récents tendent donc à montrer que l'oxydation du gaïacol conduit à un produit fortement coloré en brun rouge. Certains auteurs ont

suggéré, et quelquefois montré, que ce produit est une quinone. Cette conclusion paraît très plausible, d'autant plus que l'agrandissement du système conjugué des molécules quinoniques par rapport au gaïacol, se traduisant par un effet bathochrome, rend bien compte de l'apparition de la forte coloration dans le milieu réactionnel.

Signalons cependant les travaux de LINDGREN (76), HEWGILL et MIDDLETON (77), HEWGILL et LEE (78), qui ont obtenu avec l'oxyde d'argent, le ferrocyanure ou le persulfate comme agent oxydant, des produits non quinoniques d'oxydations couplées, tels le 4:4'-dihydroxy-3:3'-diméthoxydiphényl éther (figure 7C, page 21), le 4-hydroxy-2':3-diméthoxydiphényl éther (figure 7D, page 21) et un produit de polymérisation, $[C_6H_3O(OMe)]_n$

En définitive la grande diversité des résultats obtenus par de nombreux chercheurs et l'existence de ces réactions d'oxydations couplées ne nous permettent pas de conclure quant à la nature du produit d'oxydation du gaïacol. En effet les mécanismes d'oxydation peuvent être de différente nature (ionique, radicalaire ...). Or la pluralité des produits formés montre que, selon l'agent oxydant et le milieu, on aboutit à des mécanismes réactionnels différents. Il semble donc difficile de déduire des résultats de la littérature une unicité de mécanisme (bien que l'hypothèse radicalaire semble la plus probable (79)).

Le schéma représenté dans la figure 9 (page 24) peut en effet rendre compte des liaisons O-C et C-C formées par les monomères dans les produits notés B,C,D de la figure 7 (page 21).

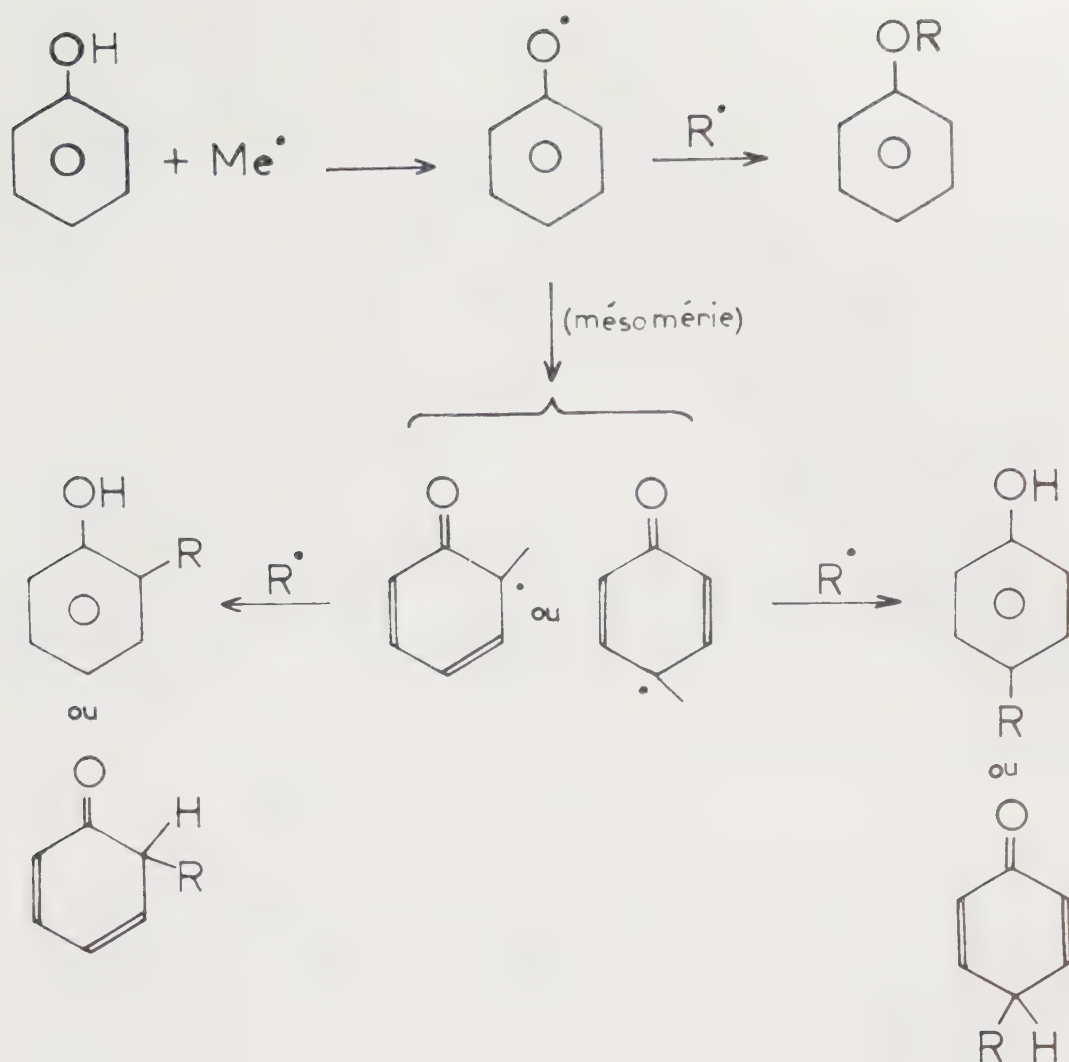


Figure 9

Schéma réactionnel (20) susceptible de rendre compte de la formation de liaisons O-C et C-C obtenues dans le produit d'oxydation du gaïacol.

Il est donc probable que la nature du produit d'oxydation soit étroitement liée à celle de l'agent oxydant utilisé. On peut cependant remarquer que le produit d'oxydation obtenu avec la peroxydase, par BOOTH et SAUNDERS (57), n'est vraisemblablement pas le 2:2'-dihydroxy-3:3'-diméthoxydiphényl. En effet, ce corps est blanc alors que le produit d'oxydation du gaïacol est coloré en brun rouge. De plus, le très faible rendement avec lequel il est obtenu par ces auteurs (20 mg à partir de 10 g. de gaïacol), permet de penser que ce n'est pas le produit majeur de la réaction, mais un produit mineur résultant, soit d'une réaction d'oxydation couplée, soit d'une réaction secondaire.

B. Mécanismes possibles de l'oxydation du gaïacol par les peroxydases.

En 1960, HOSOYA (81) a étudié l'oxydation du gaïacol catalysée par des isoperoxydases de navet. L'examen des tracés secondaires (82) a conduit cet auteur à la conclusion que l'expression de l'inverse de la vitesse initiale de la réaction (voir légende de la figure 10, page 26) en fonction de l'inverse de la concentration en eau oxygénée ou en gaïacol devait contenir un terme indépendant de la concentration en ces substrats. Pour rendre compte de ces résultats, différents selon lui, de ceux obtenus par CHANCE et MAEHLY avec HRP (50), il a proposé deux types de mécanismes.

- Les mécanismes de type A (figure 10, page 26) dans lesquels les composés I et II peuvent se combiner avec le donneur d'électrons en excès pour donner des complexes ternaires inactifs (dits "terminaux"), provoquant ainsi une inhibition de la réaction.

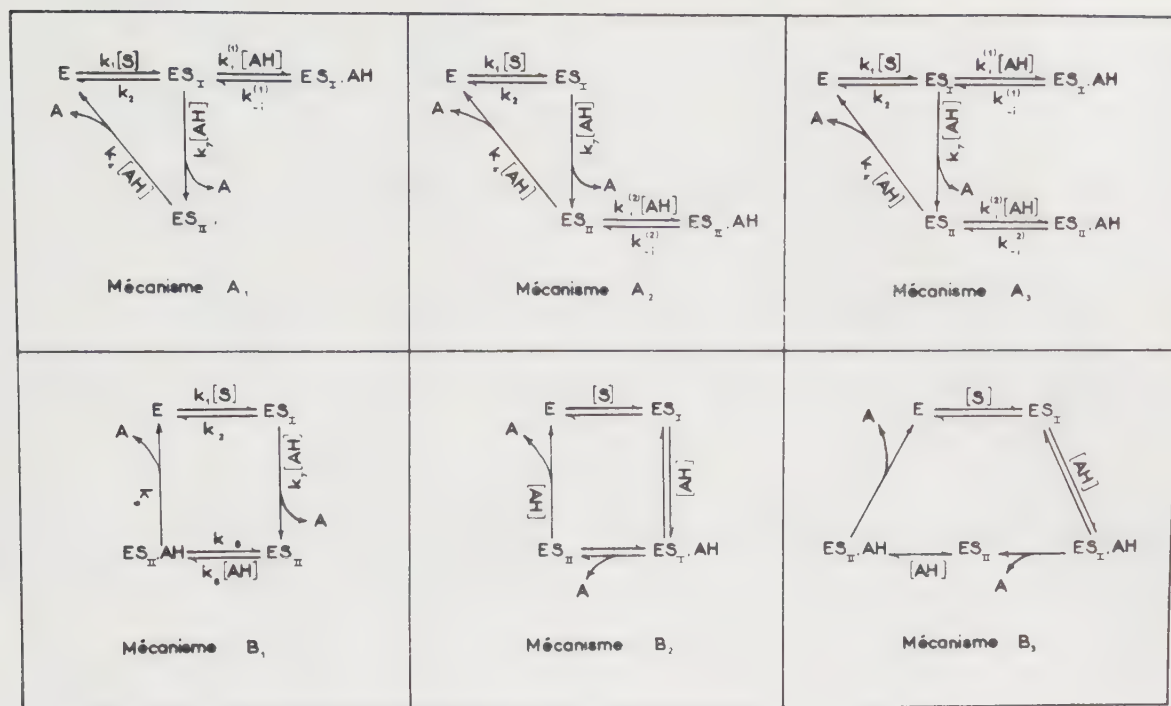


Figure 10

Mécanismes possibles de l'oxydation du gaïacol catalysée par les isoperoxydases de Navet, d'après HOSOYA (81).

Dans ces mécanismes, E représente la peroxydase, S l'eau oxygénée, AH le donneur d'électrons à l'état réduit, A le donneur d'électrons à l'état oxydé, ES_I le composé I, ES_{II} le composé II, ES_I.AH un complexe formé entre le composé I et le donneur d'électrons réduit, ES_{II}.AH un complexe formé entre le composé II et le donneur d'électrons réduit. Ces deux derniers complexes sont supposés inactifs dans les mécanismes de type A et actifs dans les mécanismes de type B.

D'après HOSOYA, l'expression de vitesse fournie par les mécanismes de type A est donnée par la relation :

$$\frac{[E]_0}{v} = \left(\frac{1}{k_7} \times \frac{k_i^{(1)}}{k_{-i}^{(1)}} + / \text{ ou } \frac{1}{k_4} \times \frac{k_i^{(2)}}{k_{-i}^{(2)}} \right) + \frac{1}{k_1[S]} + \left(\frac{1}{k_7} + \frac{1}{k_4} \right) \times \frac{1}{[AH]}$$

Figure 10 (suite)

et celle fournie par le mécanisme B 1 :

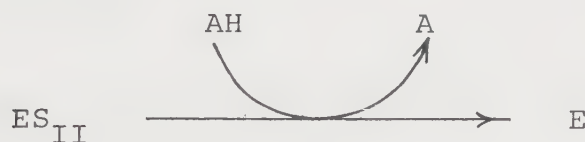
$$\frac{[E]_0}{v} = \frac{1}{k_9} + \frac{1}{k_1[S]} + \left(\frac{1}{k_7} + \frac{k_9+k_{-8}}{k_8k_9} \right) \times \frac{1}{[AH]}$$

Dans ces relations, $[E]_0$ représente la concentration totale en enzyme.

- Les mécanismes de type B (figure 10, page 26), dans lesquels les composés I et II peuvent réagir avec le donneur pour former des complexes ternaires actifs (inclus dans la séquence réactionnelle).

Il est important de remarquer que l'expression de la vitesse fournie par chacun des deux types de mécanismes (voir légende de la figure 10, page 26) est formellement identique. Ces deux mécanismes sont donc homéomorphes.*

Dans toute réaction catalysée par un enzyme, les substrats entrent, à un certain stade de la réaction, en contact avec l'enzyme ; un complexe enzyme - substrat doit donc nécessairement se former et une réaction du type



ne peut s'effectuer en une seule étape. Ainsi, parmi les mécanismes proposés par HOSOYA, le seul qui paraisse à priori plausible est le mécanisme B 3. Signalons cependant qu'un mécanisme mixte mettant en jeu à la fois des complexes ternaires actifs et ternaires inactifs fournirait des équations de vitesse formellement identiques.

Bien que le mécanisme B 1 ne soit, en toute rigueur, pas plausible, il représente cependant une image approchée de la réalité; il est en effet bien connu

* Deux mécanismes sont dits homéomorphes lorsque les expressions des vitesses fournies par ces mécanismes sont formellement identiques.

que la transition



est très rapide. La durée de vie du complexe ternaire $ES_I.AH$ qui doit nécessairement se former au cours de cette réaction est donc extrêmement brève et tout se passe en pratique comme si la transition s'effectuait en une seule étape bimoléculaire.

L'affinité de l'eau oxygénée pour la peroxydase étant extrêmement grande, on peut supposer que la première étape du mécanisme B1 est irréversible. L'oxydation du gaïacol par la peroxydase de navet pourrait ainsi s'effectuer selon le mécanisme simplifié représenté dans la figure 11, page 29).

Il est important de remarquer que ce mécanisme suppose que les deux équivalents oxydants transportés par l'enzyme sont utilisés séparément pour oxyder deux molécules distinctes de gaïacol. Nous verrons par la suite qu'on peut très bien imaginer un mécanisme dans lequel les deux équivalents oxydants sont utilisés par une seule et même molécule de gaïacol.

La détermination d'un mécanisme enzymatique ne peut donc se faire raisonnablement que si l'on connaît déjà la stoechiométrie de la réaction globale. Il est pour cette raison nécessaire d'obtenir le maximum d'informations sur le produit formé ; ceci permet, lorsque ce produit est un donneur d'hydrogène, de connaître le nombre d'atomes d'hydrogène qu'il a cédé au cours de la réaction. Il est donc très important, contrairement à ce que pensait HOSOYA, de savoir si le produit

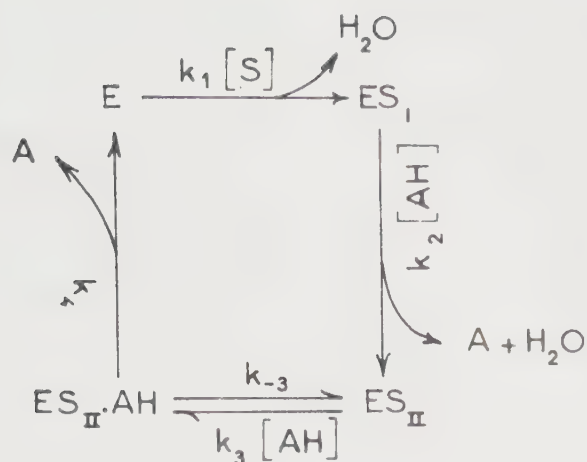


Figure 11

Mécanisme simplifié de l'oxydation du gaïacol catalysée par la peroxydase.

Dans ce schéma, E représente la peroxydase, S l'eau oxygénée, AH le donneur d'électrons à l'état réduit, A le donneur d'électrons à l'état oxydé, ES_I le composé I, ES_{II} le composé II, $\text{ES}_{II} \cdot \text{AH}$ un complexe actif formé entre le composé II et le donneur d'électrons.

L'expression de la vitesse fournie par ce mécanisme supposé à l'état stationnaire est

$$\frac{[E]_0}{v} = \frac{1}{k_4} + \left(\frac{1}{k_2} + \frac{1}{k_3} + \frac{k_{-3}}{k_3 k_4} \right) \times \frac{1}{[AH]} + \frac{1}{k_1} \times \frac{1}{[S]}$$

d'oxydation du gaïacol est le tétragaïacol (figure 8 A, page 21) ou le 2:2'-dihydroxy-3:3'-diméthoxy-diphényl (figure 8 B, page 21), ou éventuellement un autre produit; en effet, la formation du tétragaïacol suppose la recombinaison de quatre molécules de gaïacol ayant perdu chacune deux atomes d'hydrogène alors que celle du dihydroxydiméthoxydiphényl suppose la recombinaison de deux molécules de gaïacol ayant perdu chacune un seul atome d'hydrogène. Nous avons vu précédemment que la nature du produit d'oxydation du gaïacol ne pouvait pas être connue avec certitude. Dans ce cas, le nombre d'atomes d'hydrogène cédés par le donneur peut être déterminé en effectuant le titrage oxydatif du gaïacol par l'eau oxygénée en présence de peroxydase. Cette méthode, qui sera décrite dans le chapitre II, présente cependant une lacune car elle permet de déterminer uniquement le rapport des coefficients de stoechiométrie des réactifs; elle ne permet donc pas de savoir si le produit final de la réaction correspond à un monomère ou à un polymère du donneur d'électrons oxydé.

3) Oxydation du ferrocytochrome c.

Le mécanisme par lequel s'effectue l'oxydation du ferrocytochrome c par les peroxydases a été très discuté ces dernières années. Ce mécanisme présente un intérêt considérable car il correspond à un transfert d'électrons entre deux protéines. La proximité, dans la molécule de ce donneur, du fer hématinique et de la protéine (83) rend également très intéressante l'étude du mécanisme intramoléculaire des équivalents oxydants et réducteurs.

A. Oxydation du ferrocytochrome c par différents agents.

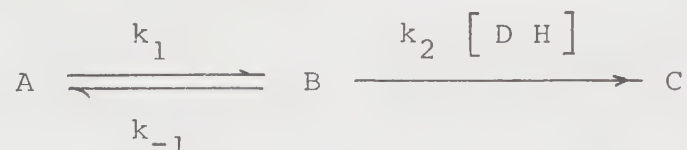
Le ferrocytochrome peut être oxydé par différentes

substances comme les ions inorganiques (Fe^{3+} , Cu^{++} ...), l'eau oxygénée, le ferricyanure, certains radicaux libres et les enzymes peroxydases et cytochrome-oxydase. En plus des peroxydases communes, de nombreuses autres hémoprotéines telles l'hémoglobine (84), la myoglobine (85) et le ferricytochrome c (86 - 87) catalysent les réactions d'oxydation du ferrocytochrome c.

D'après MOCHAN et DEGN (88), le ferricytochrome c peut catalyser la réaction d'oxydation du ferrocytochrome c d'une manière analogue aux peroxydases ; le catalyseur étant le produit de la réaction, l'oxydation est autocatalytique. L'activité oxydante du ferricytochrome c vis à vis du ferrocytochrome c est considérablement plus faible que celle de la peroxydase de levure (89). D'après NICHOLLS (90) elle est suffisamment importante pour compliquer la cinétique de l'oxydation du ferrocytochrome par la peroxydase de levure ou de raifort. A l'opposé des résultats obtenus par NICHOLLS (90) et BEETLESTONE (91), YONETANI et RAY (89) n'ont observé aucune oxydation appréciable du ferrocytochrome c en l'absence d'enzyme pour des concentrations de peroxyde inférieures à 200 μM . Ainsi, selon ces derniers auteurs, l'autoxydation (en l'absence d'enzyme) du ferrocytochrome c ne s'effectuerait qu'au delà de ces concentrations en peroxyde.

Les travaux de MARGOLIASH (92) effectués en 1954 ont montré clairement que les préparations de cytochrome c obtenues par la plupart des méthodes connues contenaient, en plus des formes monomères du cytochrome c, beaucoup de formes polymères dont les proportions variaient avec la méthode de séparation. Les conditions régissant l'interconversion des différentes formes ont

été décrites en 1962 par MARGOLIASH et LUSTGARTEN (93). Dès 1959, MARGOLIASH, FROHWIRT et WIENER (94) avaient montré que seul le monomère présentait un maximum d'activité de transfert d'électrons. En 1963, SCHEJTER et Coll. (95) ont réexaminé les coefficients d'extinction moléculaire attribués respectivement au monomère et au dimère du cytochrome c et noté que la bande à 695 nm., décrite antérieurement par THEORELL et AKESSON (96) en 1939, semblait spécifique du monomère. Cette bande d'absorption, sensible à la température et aux dénaturants protéiques reflèterait, d'après SCHEJTER et GEORGE (97), les changements de conformation de la protéine qui ne sont pas directement associés au groupement hémique chromophore. En 1965, GREENWOOD et PALMER (98) ont montré, par des méthodes cinétiques, que les espèces monomères pouvaient exister sous deux formes en solution à des pH supérieurs à la neutralité, mais qu'une seule de ces formes était apte à réagir avec l'ascorbate ou la tétrachlorohydroquinone. WILSON et GREENWOOD (99) en 1971, ont proposé, pour expliquer la cinétique biphasique de la réduction du ferricytochrome c à pH alcalin, le modèle suivant :



Dans ce mécanisme, A et B sont deux conformations en équilibre du ferricytochrome c

A est la forme irréductible* par le donneur

* appelé "cold cytochrome c" par SCHEJTER et GEORGE (97)

B est la forme réductible

C est le ferrocyclochrome c

D H est le donneur d'électrons

k_2 étant très supérieur à k_1

Selon ces auteurs, l'augmentation du pH au dessus de la neutralité déplace l'équilibre dans le sens de la formation de la forme réductible B. La cinétique de réduction du ferricytochrome c est alors constituée d'une phase initiale rapide suivie d'une autre plus lente. Par ailleurs GREENWOOD et WILSON (100) ont mis en évidence quatre espèces ionisées du ferricytochrome c dans la gamme de pH comprise entre 0 et 11, confirmant ainsi les résultats de THEORELL et AKESSON (101).

Si l'existence de plusieurs formes, réductibles et non réductibles, du ferricytochrome c a été prouvée par de nombreux chercheurs, celle de plusieurs formes, oxydables et non oxydables, du ferrocyclochrome c ne l'a jamais été à notre connaissance. A l'opposé de donneurs d'hydrogène conventionnels de la peroxydase tels que l'ascorbate, le gallicol et le pyrogallol, le ferrocyclochrome c existe sous une seule forme qui peut être oxydée, en un produit de structure bien déterminée, dans la réaction d'oxydation catalysée par la peroxydase de raifort : le ferricytochrome c. L'existence, démontrée par WILSON et GREENWOOD, d'un équilibre entre les deux formes oxydées n'est pas gênante si l'étude cinétique de cette oxydation est faite à une longueur d'onde où leurs absorptions sont identiques (par exemple à 550 nm).

B. Mécanismes possibles de l'oxydation du ferrocyclochrome c par les peroxydases.

Les premières études portant sur l'oxydation

du ferrocyclochrome c par l'eau oxygénée (102) avaient conduit à la conclusion que seule la peroxydase de levure était apte à catalyser cette réaction.

En 1951 cependant, CHANCE (103) a montré que d'autres peroxydases^{*} pouvaient aussi réaliser cette oxydation. De plus, selon cet auteur, la peroxydase de levure ne se différencierait pas des autres peroxydases car elle catalyse, elle aussi, l'oxydation de donneurs d'électrons conventionnels tels que l'acide ascorbique, le gallicol ou la paraphénylène-diamine. Les valeurs des T.N.^{**} fournies par CHANCE (24) montraient cependant que la peroxydase de levure présentait la particularité d'oxyder le ferrocyclochrome c beaucoup plus rapidement que les autres peroxydases ; elle a donc été, à juste titre, appelée ultérieurement : "cytochrome c peroxydase" ou CcP.

Une étude cinétique sommaire a conduit CHANCE à proposer un mécanisme unique, à deux voies (figure 12 A, page 35) pour toutes les peroxydases. L'oxydation catalysée par la CcP s'effectuerait par une seule voie (voie 1), tandis que celle catalysée par les autres peroxydases emprunterait les deux voies. Il est important de remarquer que les expressions des vitesses en fonction des concentrations en substrats fournies par chacune des deux voies du mécanisme n'ont pas été données par CHANCE. Si l'on désigne par k_6 la constante de vitesse de l'étape $ES_{II} \rightarrow ES_I$ et si l'on suppose la première étape du mécanisme irréversible ($k_2 \simeq 0$), on peut facilement calculer pour chacune de ces voies la vitesse à l'état stationnaire.

* peroxydase de raifort (plantes), verdoperoxydase (leucocytes), lactoperoxydase (lait).

** Abréviation de "Turn over Number" maximum.

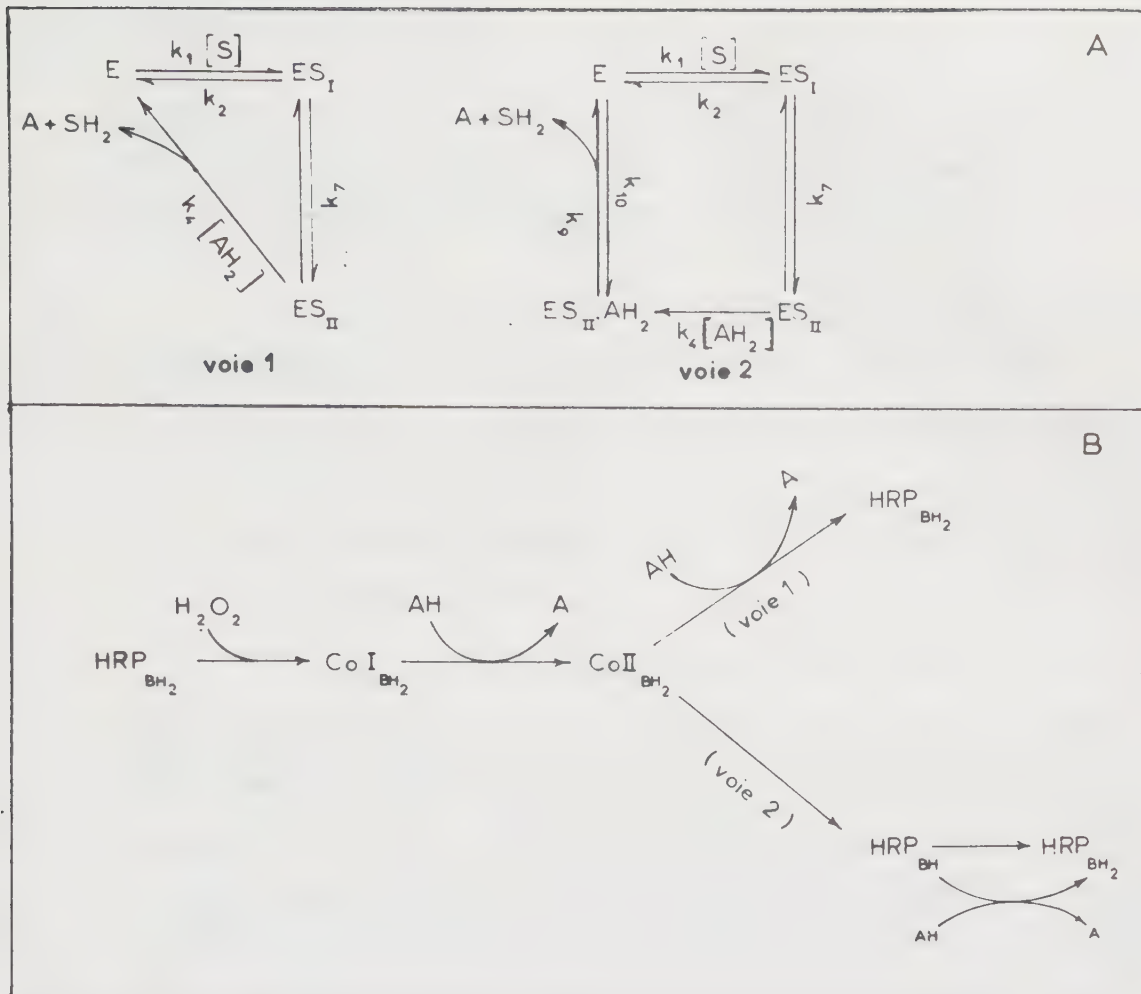


Figure 12

Mécanismes susceptibles d'expliquer l'oxydation du ferrocytochrome c catalysée par la peroxydase de Raifort.

A. Premier mécanisme proposé par CHANCE (103) pour expliquer l'oxydation du ferrocytochrome c par les peroxydases.

- Le mécanisme de la HRP correspondrait aux voies 1 et 2.
- Le mécanisme de la CcP correspondrait à la voie 1 uniquement.

Dans ce schéma, E désigne la peroxydase, S l'eau

Figure 12 (suite)

oxygénée, AH_2 le donneur d'électrons sous sa forme réduite, A et SH_2 les produits de la réaction, ES_I le composé I et ES_{II} un composé d'isomérisation du composé I.

B. Mécanisme proposé par NICHOLLS (105) pour expliquer l'oxydation du ferrocytochrome c par la HRP.

- Aux forces ioniques faibles, l'oxydation s'effectuerait par la voie 1;
- Aux forces ioniques élevées, l'oxydation s'effectuerait par la voie 2.

Dans ce mécanisme, HRP_{BH_2} représente la peroxydase de Raifort, BH_2 le donneur d'électrons endogène associé à la protéine enzymatique, CoI_{BH_2} le composé I, $CoII_{BH_2}$ le composé II, AH le donneur d'électrons qui subit la réaction d'oxydation, HRP_{BH} la peroxydase dans laquelle le donneur d'électrons endogène a été oxydé, A le produit d'oxydation.

Pour la voie 1 on obtient

$$v = \frac{k_1 k_7 k_4 [E]_0 [S] [AH_2]}{k_1 (k_6 + k_7) [S] + k_4 k_7 [AH_2] + k_1 k_4 [S] [AH_2]}$$

et pour la voie 2 :

$$v = \frac{k_1 k_7 k_4 k_9 [E]_0 [S] [AH_2]}{k_1 (k_6 k_9 + k_7 k_4) [S] + k_7 k_4 k_9 [AH_2] + k_1 k_9 (k_4 + k_7) [S] [AH_2]}$$

Les expressions de ces deux vitesses étant formellement identiques, ces deux voies différentes ne permettent pas d'expliquer, contrairement à ce que pensait CHANCE, les différences de comportement qu'il avait constatées entre la cytochrome c peroxydase et les autre peroxydases.

Quelques années plus tard, les travaux de CHANCE (20, 24) et de GEORGE (21, 22, 23, 104) ont permis à CHANCE et Coll. (48, 49) d'établir un nouveau mécanisme général de l'oxydation des donneurs d'électrons par les peroxydases (figure 7 C, page 17). Ce mécanisme, discuté antérieurement, présente l'avantage de rendre compte de la stoechiométrie électronique de la réaction globale et en même temps des degrés d'oxydation différents du composé I, du composé II et de la ferri-peroxydase. Nous verrons cependant par la suite, qu'un mécanisme faisant intervenir un complexe ternaire actif entre l'enzyme et ses deux substrats est plus satisfaisant.

En 1960, BEETLESTONE (91) a étudié l'oxydation du ferrocyclochrome c par la peroxydase de levure (Ccp) et constaté que celle-ci réagissait au moins cent fois plus vite que la peroxydase de raifort, et que le rapport

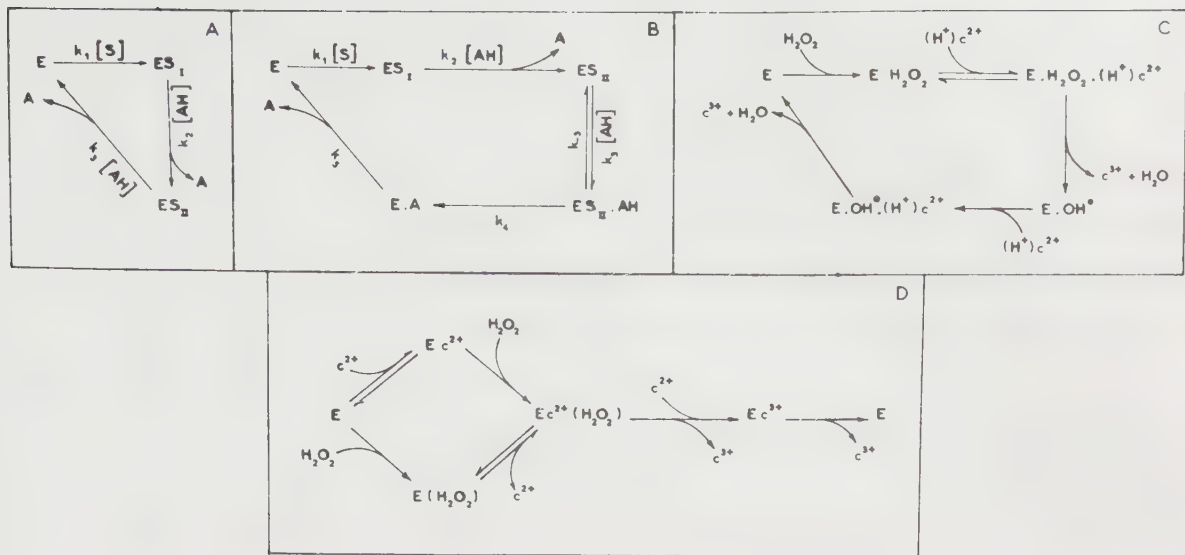


Figure 13

Mécanismes susceptibles d'expliquer l'oxydation du ferrocyanochrome c catalysée par la cytochrome c peroxydase.

- A. Mécanisme proposé par BEETLESTONE (91)
- B. Premier mécanisme proposé par NICHOLLS (105)
- C. Mécanisme proposé par YONETANI et RAY (89, 108)
- D. Deuxième mécanisme proposé par NICHOLLS (110, 111)

Dans ces mécanismes, E représente la cytochrome c peroxydase. L'eau oxygénée est représentée par S (mécanismes A et B) ou H₂O₂ (mécanismes C et D), le ferrocyanochrome c par AH (mécanismes A et B) ou (H⁺)c²⁺ (mécanisme C) ou c²⁺ (mécanisme D), le ferricytochrome c par A (mécanismes A et B) ou c³⁺ (mécanismes C et D), le composé I par ES_I (mécanismes A et B) ou E.H₂O₂ (mécanismes C et D), le composé II par ES_{II} (mécanismes A et B) ou E.OH[•] (mécanisme C).

entre la quantité d'eau oxygénée décomposée et celle de cytochrome c oxydé était approximativement de deux. Ce résultat lui a permis de vérifier, avec le système "Ccp, ferrocytochrome c, eau oxygénée", le mécanisme général proposé par CHANCE et Coll. (figure 7C, page 17) pour toutes les peroxydases et tous les donneurs d'électrons. Le mécanisme de BEETLESTONE (figure 13A, page 37) différerait cependant de celui de CHANCE et Coll. car il supposait toutes les étapes irréversibles.

En 1964, NICHOLLS (105) a étudié à son tour l'oxydation du ferrocytochrome c par les peroxydases de levure et de raifort. Comme CHANCE en 1952 (20), il est arrivé à la conclusion que les mécanismes de ces deux enzymes étaient différents.

- Le mécanisme de la cytochrome c-peroxydase (figure 13B, page 37) serait selon lui identique à celui de la cytochrome-oxydase en raison de certaines analogies qu'il avait constatées entre ces deux enzymes (inhibition de la réaction par les cations Na^+ et K^+ , par la salmine et par le ferri et ferrocytochrome c ; cinétiques d'ordre un).

- Le mécanisme de la peroxydase de raifort (figure 12B, page 35) serait par contre plus complexe. D'après NICHOLLS, l'oxydation s'effectuerait par deux voies différentes selon les conditions expérimentales de force ionique : aux forces ioniques faibles, le ferrocytochrome c serait directement oxydé par le composé II (voie 1 de la figure 12B) selon le processus classique décrit par CHANCE et Coll. (figure 7 C, page 17) ; aux forces ioniques élevées, cette voie serait bloquée et le ferrocytochrome réagirait dans une deuxième voie avec un donneur endogène, présent dans toutes les peroxydases (23), probablement associé à la protéine enzymatique. Ce donneur endogène serait préalablement oxydé par le composé II dans une étape limitante incluse dans la

séquence réactionnelle constituant cette deuxième voie. La présence d'une étape limitante , indépendante de la concentration en ferrocyclochrome c, pourrait ainsi rendre compte de l'ordre zéro observé par NICHOLLS. Il serait important de souligner qu'aucune expérience sérieuse n'a été effectuée par NICHOLLS pour prouver les mécanismes qu'il a proposés pour la HRP et la CcP.

En 1965, YONETANI et RAY (107) ont mis au point une méthode de purification permettant d'obtenir une cytochrome c peroxydase hautement purifiée. Ils ont ensuite étudié (89 , 108) son mécanisme d'action en utilisant les méthodes classiques (82 , 109) d'analyse de la cinétique enzymatique et ont pu montrer que la réaction d'oxydation du ferrocyclochrome c s'effectuait selon un mécanisme linéaire ordonné (figure 13 C, page 37) très peu différent de celui proposé par NICHOLLS (figure 13 B, page 37).

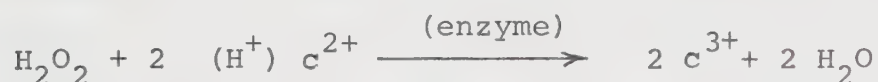
En 1971, NICHOLLS et MOCHAN (110, 111) ont à nouveau étudié l'oxydation du ferrocyclochrome catalysée par la CcP. Ils ont, cette fois, utilisé une CcP hautement purifiée et ont alors constaté des différences notables dans le comportement cinétique des CcP préparées par la méthode d'ABRAMS et Coll. (106) qu'il avait déjà utilisée (105), et par la méthode plus récente de YONETANI et RAY (107). Ces auteurs ont pu mettre en évidence par ultracentrifugation analytique et par tamisage moléculaire (112), l'existence d'un complexe CcP-cytochrome c. Ils ont alors préféré (110, 111), à la place du mécanisme ordonné proposé par YONETANI et RAY (figure 13 C, page 37), un mécanisme au hasard "partiellement à l'équilibre", représenté dans la figure 13 D, page 37).

En fait, NICHOLLS et MOCHAN (111), à l'opposé de YONETANI et RAY (89 , 108) n'ont pas effectué d'analyse sérieuse de leur résultats expérimentaux. Le nouveau modèle qu'ils ont proposé ne repose donc sur aucun fondement.

En définitive, il semblerait (105) que le mécanisme de l'oxydation du ferrocytochrome c par la HRP s'effectue, aux forces ioniques faibles, selon le processus classique décrit par CHANCE et Coll. (figure 7 C, page 17).

Le mécanisme de cette oxydation, catalysée par CcP, bien que controversé, est, en raison des observations critiques qui viennent d'être faites, plus vraisemblablement le mécanisme linéaire ordonné proposé par YONETANI et RAY (89 , 108 , fig. 13 D, page 37), que le mécanisme au hasard proposé par NICHOLLS et MOCHAN (110 , 111 , fig. 13 D, page 37).

D'après YONETANI et RAY, l'équation globale de la réaction d'oxydation du ferrocytochrome c est la suivante :



Cette équation montre que deux molécules de ferrocytochrome participent à la réaction. L'interaction simultanée de deux molécules de ferrocytochrome c sur le complexe enzyme- H_2O_2 pour former un complexe quaternaire serait, selon eux, exclue car les tracés primaires de LINEWEAVER-BURK $[\text{E}]_0/v = f (1 / [(\text{H}^+) \text{ c}^{2+}])$ que l'on obtiendrait dans ce cas, pour des concentrations données de peroxyde, ne seraient plus linéaires. En fait, on peut montrer sur un exemple simple que la fixation séquentielle de deux molécules de ferrocytochrome c sur le composé I, pour

former un complexe quaternaire, peut donner des tracés primaires linéaires. Il suffit en effet de supposer que les étapes de fixation des deux molécules de ferrocytochrome sur le composé I sont séparées par au moins une étape irréversible. Un exemple de mécanisme de ce type est représenté dans la figure 14, page 42 . Malgré cette remarque restrictive, il n'en demeure pas moins que l'interaction simultanée ou séquentielle de deux molécules de ferrocytochrome c pour former un complexe quaternaire avec l'enzyme et le peroxyde est peu vraisemblable. On peut en effet penser que la première molécule de ferrocytochrome c, dont l'encombrement stérique est important, va, en réagissant, masquer le centre actif de l'enzyme et empêcher ainsi la fixation de la deuxième molécule de ferrocytochrome c dont l'encombrement stérique est également très important.

Par contre, la formation d'un complexe ternaire formé par la cytochrome c peroxydase, le peroxyde et le ferrocytochrome c est plausible et même très probable. Nous avons déjà vu qu'un mécanisme analogue a été proposé par HOSOYA (81) dans son étude de l'oxydation du gaïacol par les peroxydases de navet (figure 10 B1, page 26)

Cette analogie permet de penser qu'en définitive le mécanisme de l'oxydation du ferrocytochrome c par les peroxydases végétales ou de levure est le même. Rappelons qu'un mécanisme simplifié, correspondant à une image plus fidèle de la réalité, et homéomorphe de celui proposé par YONETANI et RAY (figure 13C, page 37), ou de ceux proposés par HOSOYA (figure 10, page 26) peut être suggéré (figure 11, page 29).

Nous reprendrons cette discussion, dans les chapitres suivants, lors de l'étude du mécanisme catalytique d'une isoperoxydase de raifort purifiée.

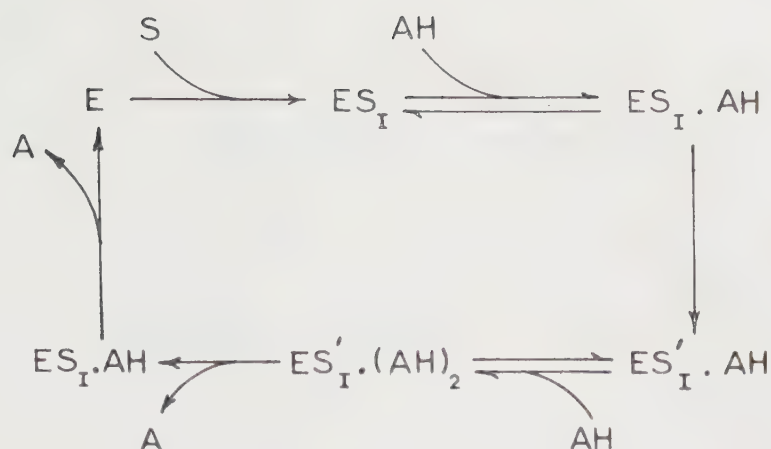


Figure 14

Exemple d'un mécanisme d'oxydation peroxydative du ferro-cytochrome c supposant la formation d'un complexe quaternaire permettant d'obtenir des tracés primaires linéaires.

L'expression de la vitesse de réaction fournie par ce mécanisme vérifie la relation suivante :

$$\frac{[E]_0}{v} = \bar{\Phi}_0 + \frac{\bar{\Phi}_1}{[S]} + \frac{\bar{\Phi}_2}{[AH]}$$

dans laquelle $\bar{\Phi}_0$, $\bar{\Phi}_1$, $\bar{\Phi}_2$ sont des paramètres de DALZIEL (82), $[E]_0$ la concentration totale en enzyme et v la vitesse initiale à l'état stationnaire.

CHAPITRE II

METHODES D'ETUDE

Nous avons cité et décrit dans ce chapitre les différentes techniques utilisées.

I. Chromatographie et tamisage moléculaire.

1) Chromatographie et tamisage moléculaire sur gel de Sephadex.

Nous avons utilisé une méthode d'isolement et de purification des isoperoxydases de Raifort mise au point dans notre laboratoire par MAZZA et Coll. (113) sur les isoperoxydases de Navet. Cette méthode nécessite l'emploi de techniques de chromatographie et de tamisage moléculaire. Des gels de Sephadex de Pharmacia (Uppsala, Suède) sont utilisés. Les échanges de cations sont effectués sur carboxy-méthyl Sephadex C-50; les échanges d'anions sur diéthyl-amino-éthyl Sephadex A-50; le tamisage moléculaire sur Sephadex G-100. Le Sephadex est mis à gonfler dans un grand volume de tampon. Le gonflement est réalisé en laissant reposer la suspension pendant au moins trois jours. La colonne est alors remplie par gravimétrie. On laisse ensuite passer le courant de tampon pendant environ quarante huit heures pour que le gel se stabilise.

2) Chromatographie sur résine Amberlite.

La purification du cytochrome c s'effectue par une méthode chromatographique d'échange d'ions qui sera

décrite dans le chapitre V. La résine (Amberlite IRC 50 ou CG 50 H fournie par Paris-Labo) est préparée par la méthode de SLONIMSKI (114) : la résine est mise en suspension dans l'eau distillée pendant quatre heures. L'eau de suspension est renouvelée toutes les heures pour éliminer les fines particules. Puis la résine est convertie en sel sodique par addition de NaOH concentré (le pH doit monter au moins jusqu'à 10). La soude en excès est ensuite éliminée par lavages avec l'eau distillée. Les impuretés restantes sont oxydées dans une solution d'hypochlorite de sodium au 1/20ème (solution Prolabo. d=1,05) pendant douze heures. La résine décantée est enfin mise en suspension dans le tampon Sorensen pH 7, 0,1 M. Le pH, variable au début, est stabilisé en rajoutant par petites portions de la soude 6 N.

3) Chromatographie sur couche mince de silice.

Le test d'homogénéité du produit d'oxydation du gaïacol est réalisé par la technique de chromatographie sur couche mince de gel de silice. Le produit à analyser est dissous dans un solvant convenablement choisi. Une goutte de la solution est déposée à l'aide d'un capillaire sur la plaque supportant la couche mince de gel. La plaque est ensuite disposée verticalement dans une cuve en verre contenant le solvant dont les vapeurs en saturant l'atmosphère. Le point correspondant au dépôt du produit sur la plaque doit être situé au dessus du niveau du solvant. La montée, par capillarité, de ce dernier le long de la plaque provoque l'élution du produit. La migration de la tache peut être suivie par éclaircissement en ultra-violet à deux longueurs d'onde différentes. La tache doit être retardée par rapport au front du solvant. Pour cela, plusieurs essais sont effectués avec différents solvants et mélanges de solvants de polarité variable.

II. Electrophorèses sur acétate de cellulose.

Les électrophorèses des solutions de peroxydase sont effectuées sur bandes d'acétate de cellulose de type Cellogel, fournies par Chemestron, dans une cuve universelle de Kohn fournie par Shandon. La migration a lieu sous une intensité régulée de 2 mA par bande (alimentation stabilisée Vernon), dans un tampon phosphate d'ammonium 0,05 M, pH 6,8, à 40° C et pendant 90 minutes.

La révélation de l'activité peroxydasique sur les bandes est obtenue par une technique dérivée de celle de JERMYN et THOMAS (5) et de VAN DUIJN (115). On plonge les bandes d'électrophorèse dans une solution de benzidine à 400 mg/l, additionnée de 5 ml de H_2O_2 1 M. On les transfère ensuite dans une solution de NH_4Cl à 5%, ce qui a pour effet de stabiliser la couleur obtenue avec la benzidine. La révélation des protéines est effectuée à l'aide du noir amido (116). On détermine l'intensité et l'emplacement des tâches révélées, à l'aide d'un photomètre enregistreur et intégrateur VERNON.

III. Dosage de l'hématine.

La détermination quantitative de l'hématine, nécessaire au calcul des extinctions moléculaires et de la masse moléculaire de l'isoperoxydase isolée, est faite par la technique du pyridine-hémochromogène de KEILIN et HARTREE (10).

IV. Estimation de la concentration et du degré de pureté des différents réactifs utilisés.

1) Isoperoxydase P_2 de Raifort.

La concentration en isoperoxydase P_2 de Raifort

est obtenue par la mesure de l'absorbance à 403 nm des solutions utilisées. On prendra pour valeur du coefficient d'extinction moléculaire, celle déterminée dans le chapitre III, page 82 ($\epsilon^{403} = 89,8 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Le degré de pureté de l'enzyme est estimé par la mesure de son activité spécifique exprimée en unités arbitrairement choisies, et par la valeur de son R.Z.

- Nous avons convenu de prendre, comme unité d'activité spécifique, l'augmentation d'absorbance (à 470 nm par unité de temps et par mg de protéine) provoquée par l'introduction d'un volume déterminé d'enzyme dans un milieu réactionnel tamponné, contenant un excès d'eau oxygénée et de gaïacol. La masse protéique est calculée en supposant que l'absorbance à 280 nm d'une solution de protéine à 1 mg/ml est égale à l'unité.

- Le R.Z. (Reinheitssal) est le rapport des absorbances au pic de Soret et au maximum d'absorbance de la protéine.

2) Gaïacol.

Le gaïacol utilisé est fourni à l'état cristallisé et rigoureusement pur par Prolabo. Ce produit étant incolore, nous avons pu vérifier qu'il ne renfermait pas de forme oxydée, colorée, en faisant son spectre dans le visible en solution aqueuse.

3) Eau oxygénée.

L'eau oxygénée est fournie par Merck. Cette solution à 100 volumes est diluée convenablement de façon à

obtenir une solution stock rigoureusement molaire à partir de laquelle sont préparées extemporainement des solutions plus diluées.

Le titre des solutions d'eau oxygénée est déterminé grâce à un dosage en milieu acide avec une solution titrée de permanganate de potassium (117).

4) Cytochrome c.

Le cytochrome c utilisé est extrait de coeur de cheval, (Type III); il est fourni par Sigma Chemical Company. La présence éventuelle de formes autoxydables non désirables du cytochrome c nécessite leur élimination. Celle-ci est effectuée par une méthode qui sera exposée dans le chapitre IV. La concentration molaire en cytochrome autoxydable est déterminée par la méthode spectrophotométrique de Tsou (118) qui consiste à mesurer les absorbances à 550 nm de la solution de cytochrome c après réduction par l'hydrosulfite de sodium, et après un barbotage ultérieur d'un courant d'oxyde de carbone pur. La relation ci-dessous permet de faire ce calcul :

$$\left[\text{cyt } c_{\text{autox}} \right] = \frac{A_{\text{red}} - A_{\text{CO}}}{\epsilon_{\text{red}} - \epsilon_{\text{CO}}}$$

où

A_{red} = absorbance à 550 nm après réduction par $\text{S}_2\text{O}_4\text{Na}_2$

A_{CO} = absorbance à 550 nm après réduction par $\text{S}_2\text{O}_4\text{Na}_2$ et barbotage du CO.

ϵ_{red} = coefficient d'extinction moléculaire du ferrocycyochrome c à 550 nm ($27,7 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

ϵ_{CO} = coefficient d'extinction moléculaire du composé carboxyferrocytochrome c formé à partir du cytochrome c autoxydable à 550 nm ($10,7 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Lorsque la concentration en forme autoxydable est nulle, la concentration totale en cytochrome c est donnée par la relation :

$$[\text{cyt c}]_{\text{totale}} = \frac{A_{\text{red}}}{\epsilon_{\text{red}}}$$

Dans le cas où le cytochrome est partiellement oxydé, la détermination du pourcentage de forme oxydée nécessite la connaissance du coefficient d'extinction moléculaire de la forme oxydée que nous prendrons égal à :

$$\epsilon_{\text{ox}}^{550 \text{ nm}} = 9,2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \quad (92).$$

V. Composition en amino-acides de l'isoperoxydase P_2 de Raifort.

La composition en amino-acides de la peroxydase P_2 de Raifort est déterminée sur l'apoprotéine obtenue par clivage en milieu butanone-HCl, selon la méthode de TEALE (119). La détermination est faite par la technique classique (29) à l'aide d'un appareil automatique du type "Biochrom" (Biocal). On utilise un temps d'hydrolyse sous vide de 24 heures à 110° C. La cystéine et la cystine sont dosées sous forme d'acide cystéique, après oxydation performique de l'apoprotéine selon la technique de HIRS (120). Dans ce cas, le temps d'hydrolyse est de 20 heures. Deux essais ont toujours été réalisés pour chacune des analyses.

VI. Détermination de la masse moléculaire et de la constante de sédimentation de l'isoperoxydase P₂ de Raifort.

La détermination de la masse moléculaire est effectuée par trois méthodes.

- Par pesée, en faisant l'hypothèse que l'isoperoxydase isolée, purifiée et lyophilisée est pure, et que la peroxydase contient un hème par molécule. Le contenu hématinique est déterminé par la technique du pyridine hémochromogène (10).

- Par filtration moléculaire sur Sephadex G-100, selon la technique de WHITAKER (28). Cette technique nécessite l'établissement de la courbe reliant la masse moléculaire connue de protéines et le K_{av}^* (fraction de la phase gel permise à la protéine) de ces protéines. A partir de la droite obtenue et du volume d'élution de l'isoperoxydase, il est donc possible de déterminer la valeur de sa masse moléculaire. Les protéines utilisées pour l'étalonnage sont la ribonucléase (M.M = 13 600), le chymotrypsinogène A de boeuf (M.M = 25 000), la pepsine (M.M = 65 000).

$$* K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_x} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

V_e étant le volume d'élution

V_o étant le volume mort de la colonne

V_x étant le volume du gel

V_t étant le volume total

Le Sephadex possédant quelques groupements ionisables (-COOH), est équilibré avec un tampon de force ionique assez élevée (tampon acétate de sodium 0,1 M, pH 6, NaCl 0,5 M) pour éviter le phénomène d'échange d'ions.

- Par ultracentrifugation analytique. Cette méthode permet également de déterminer la constante de sédimentation. L'ultracentrifugation est effectuée à température de 20°, avec une ultracentrifugeuse SPINCO modèle E, équipée d'un télétachymètre digital permettant de contrôler la vitesse choisie à un tour près. La masse moléculaire est déterminée par la méthode d'YPHANTIS (121) basée sur l'équilibre de sédimentation obtenu à grande vitesse. Suivant cette méthode, on détermine la variation de la concentration du soluté en fonction de la distance à l'axe de rotation. Cette concentration est déterminée avec le système optique interférométrique de RAYLEIGH. La constante de sédimentation, $S_{20,w}^C$, est déterminée par la mesure du déplacement du front de sédimentation à partir du temps t_0 , temps au bout duquel la vitesse de rotation de 59 780 tours/minute est atteinte. Ce déplacement est mesuré par le système optique SCHLIEREN.

Les ultracentrifugations analytiques ont été réalisées par Mademoiselle J. SAVARY, dans le laboratoire de Monsieur le Professeur J. REYNAUD (Laboratoire de Biochimie, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Marseille).

VII. Spectrométrie.

1) Spectrophotométrie dans le visible et l'ultra-violet.

A. Spectres.

Les enregistrements des spectres sont effectués

à l'aide de spectrophotomètres différentiels thermostatés enregistreurs. Les appareils suivants sont utilisés :

- . Spectronic 505 Bausch et Lomb
- . Spectralux 1800 Safas. Monaco. France
- . Carry 15
- . Perkin Elmer 402

Les échantillons (peroxydase, eau oxygénée, gaïacol, produit d'oxydation du gaïacol, ferro et ferricytochrome) sont étudiés en phase aqueuse. Le produit d'oxydation du gaïacol est également étudié en solution dans un solvant organique.

B. Cinétiques : mesure de la vitesse de réaction.

Les cinétiques de l'oxydation du gaïacol et du ferrocytochrome c en présence de peroxydase sont enregistrées à longueur d'onde fixe sur des spectrophotomètres thermostatés à 25° C, munis d'enregistreurs Sefram et d'un dispositif d'agitation dans la cellule de mesure. La réaction est déclenchée par l'injection d'un faible volume de réactif à l'aide d'une seringue dont l'aiguille traverse la paroi supérieure du compartiment contenant les cuves spectrophotométriques. Ce montage a donné entière satisfaction sur les spectrophotomètres Spectralux 1800 et Jobin et Yvon type Maroc.

La valeur de la vitesse d'oxydation du gaïacol (exprimée en mole de gaïacol oxydé par seconde) est donnée par la relation :

$$v_i = \frac{1}{\epsilon_{470}} \frac{\Delta A_{470}}{\Delta t(\text{sec})}$$

dans laquelle $\frac{\Delta A_{470}}{\Delta t(\text{sec})}$ représente la pente à l'origine de la courbe donnant la variation de l'absorbance à 470 nm (pic d'absorption du produit d'oxydation du gaïacol) en fonction du temps, et ϵ_{470} représente le coefficient d'extinction moléculaire du produit d'oxydation du gaïacol à 470 nm exprimé en $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Sa valeur, déterminée par une courbe de titrage (figure 24, page 89), est égale à $5,6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (pour une mole de gaïacol oxydé).

La valeur de la vitesse d'oxydation du ferrocytochrome c est donnée par la relation

$$v_i = \frac{1}{\Delta \epsilon_{550}^{\text{red-ox}}} \cdot \frac{\Delta A_{550}}{\Delta t (\text{sec})}$$

dans laquelle $\frac{\Delta A_{550}}{\Delta t(\text{sec})}$ représente la pente à l'origine de la courbe donnant la variation de l'absorbance à 550 nm (pic d'absorption du ferrocytochrome c dans le visible) en fonction du temps, et $\Delta \epsilon_{550}^{\text{red-ox}}$ représente la différence des coefficients d'extinction moléculaire à 550 nm des formes réduite et oxydée du cytochrome c. La valeur de $18,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (92) sera utilisée dans nos calculs.

2) Spectrophotométrie dans l'infrarouge.

Les spectres I.R. du produit d'oxydation du gaïacol sont effectués sur un spectrophotomètre Perkin Elmer, Modèle 225 du Centre Technique de Spectrographie Infra-Rouge, Faculté des Sciences Saint-Charles, Marseille.

L'échantillon est étudié soit en phase solide (pastille de KBr) soit en phase liquide (en solution dans un solvant organique).

3) Spectrométrie de masse.

La masse du produit d'oxydation du gaïacol à l'état solide est déterminée à l'aide d'un spectromètre de masse A.E.I. (Associated Electric Industry) M.S.9 du Laboratoire de Chimie Organique, Faculté des Sciences Saint-Jérôme, Marseille.

4) Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire.

Le spectre de R.M.N. du produit d'oxydation du gaïacol est effectué sur un spectromètre de R.M.N. Varian A 60 de l'Ecole de Chimie de Marseille. L'échantillon est étudié en solution dans le chloroforme deutérié.

VIII. Calcul hybride.

La simulation de la réaction d'oxydation du ferrocyclochrome c par l'isoperoxydase P_2 de Raifort a été réalisée à l'aide d'un calculateur analogique E.A.I. 8800 (Electronic Associates Inc.) couplé à un calculateur numérique E.A.I. 640 au Centre de Calcul de Cadarache, en collaboration avec Messieurs les Ingénieurs CAMBE et DI FALCO. L'utilisation du calculateur numérique permet un pilotage automatique du calculateur analogique, un calcul répétitif à grande vitesse, et la visualisation des résultats en permanence sur un oscilloscope. Ainsi, on peut voir instantanément l'influence des différentes constantes de vitesse sur l'allure des cinétiques de l'oxydation du ferrocyclochrome c par la peroxydase.

IX. Interprétation des courbes théoriques de titrage par l'eau oxygénée d'un donneur d'électrons.

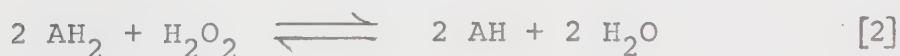
Dans une réaction d'oxydation par l'eau oxygénée, le nombre d'électrons acceptés par chaque molécule d'eau oxygénée est de deux. La réaction globale d'oxydo-réduction peut s'écrire de différentes manières selon la valeur du nombre N d'électrons cédés par la molécule de donneur et selon la nature du produit P d'oxydation qui peut être un monomère ou un polymère. Les courbes de titrage correspondantes peuvent donc différer suivant que l'on considère un mécanisme ou un autre. Une analyse est ainsi susceptible de fournir des renseignements intéressants si l'on connaît les caractéristiques théoriques des courbes relatives aux différentes hypothèses possibles. Nous discutons ici la théorie des courbes de titrage. L'application aux résultats expérimentaux sera exposée dans les chapitres IV et V.

1) Le donneur d'électrons peut échanger un électron (N=1).

A. Le produit d'oxydation P est un monomère du donneur d'électrons oxydé : P = AH.

Soit AH_2 le donneur d'électrons sous sa forme réduite. S'il ne peut perdre qu'un seul électron, sa forme oxydée sera AH. Le produit P étant un monomère du donneur d'électrons oxydé, on a $P = AH$.

Dans ce cas la réaction globale peut s'écrire :



Supposons que les concentrations initiales en donneur réduit et en eau oxygénée soient respectivement 1 et h (en M). Soit x la concentration du produit P à

l'équilibre et K la constante d'équilibre. La concentration en eau dans le milieu réactionnel peut être considérée comme constante et donc incluse dans la constante d'équilibre et on a la relation :

$$K = \frac{x^2}{(1-x)^2 (h - \frac{x}{2})} \quad [3]$$

Lorsque K n'est pas infiniment grand, x est inférieur à 1 et à 2 h donc différent de 1 et 2 h. La relation [3] peut alors s'écrire :

$$K x^3 + 2 \left[1 - K (h+1) \right] x^2 + K (4h+1) - 2 Kh = 0 \quad [4]$$

x est donc racine de cette équation du 3ème degré avec :

$$x < 2 h \quad [5]$$

$$x < 1 \quad [6]$$

Principe du calcul de la racine.

L'équation [4] est de la forme

$$x^3 + a_1 x^2 + a_2 x + a_3 = 0 \quad [7]$$

posons $x = \mu - \frac{a_1}{3}$, l'équation [7] devient

$$\mu^3 + (a_2 - \frac{a_1^2}{3})\mu + (a_3 - \frac{a_2 a_1}{3} + \frac{2}{27} a_1^3) = 0 \quad [8]$$

Si l'on pose ensuite

$$p = a_2 - \frac{a_1^2}{3} \quad \text{et} \quad q = a_3 - \frac{a_2 a_1}{3} + \frac{2}{27} a_1^3$$

L'équation [8] se transforme en :

$$\mu^3 + p\mu + q = 0 \quad [9]$$

Les équations [7] ou [9] admettent 3 racines :

1er cas : $4 p^3 + 27 q^2 < 0$: 3 racines réelles distinctes

2ème cas : $4 p^3 + 27 q^2 > 0$: 1 racine réelle + 2 racines complexes conjuguées.

3ème cas : $4 p^3 + 27 q^2 = 0$: 1 racine réelle + 1 racine double.

Nous avons effectué les calculs* pour les valeurs de K égales à 100; 1; 0,1 et des valeurs de h comprises entre 0 et 1,8. Dans chacun de ces cas, l'expression $4 p^3 + 27 q^2$ est positive. L'équation [4] n'a donc qu'une seule racine réelle. Le calcul de cette racine réelle** a été fait par la méthode itérative de NEWTON .

Soit P (x) le membre de gauche de l'équation [4], P' (x) sa dérivée par rapport à x, x_i une valeur quelconque attribuée à x. La formule itérative est la suivante :

$$x_{i+1} = x_i - \frac{P(x_i)}{P'(x_i)} \quad [10]$$

* Les calculs ont été effectués sur une machine à calculer Friden

** Chaque racine a été calculée au millième près.

Les calculs sont considérablement facilités si l'on remarque que

$$\begin{aligned} x &< 2h && \text{pour } h < 1/2 \\ \text{et} \\ x &< 1 && \text{pour } h > 1/2 \end{aligned}$$

La courbe donnant la variation de la concentration x en produit, P , d'oxydation du donneur, en fonction du rapport, R , des concentrations initiales en eau oxygénée et en donneur ($R = \frac{h}{1} = h$) est représentée dans la figure 15 A (page 58).

B. Le produit d'oxydation P est un dimère du donneur d'électrons oxydé : $P = A_2H_2$.

La réaction globale s'écrit :



Supposons que les concentrations initiales en donneur réduit et en eau oxygénée soient respectivement 2* et h (en M). Soit x la concentration du produit, P , de la réaction ($P = A_2H_2$) à l'équilibre, et K la constante d'équilibre. On a la relation :

$$K = \frac{x}{4 (1 - x)^2 (h - x)} \quad [12]$$

* En prenant une concentration initiale en donneur réduit de 2, la concentration à l'équilibre du produit d'oxydation sera, comme dans le cas précédent, au plus égale à 1. On peut ainsi comparer plus facilement les tracés théoriques obtenus en faisant des hypothèses différentes sur la valeur de N et sur la nature de P .

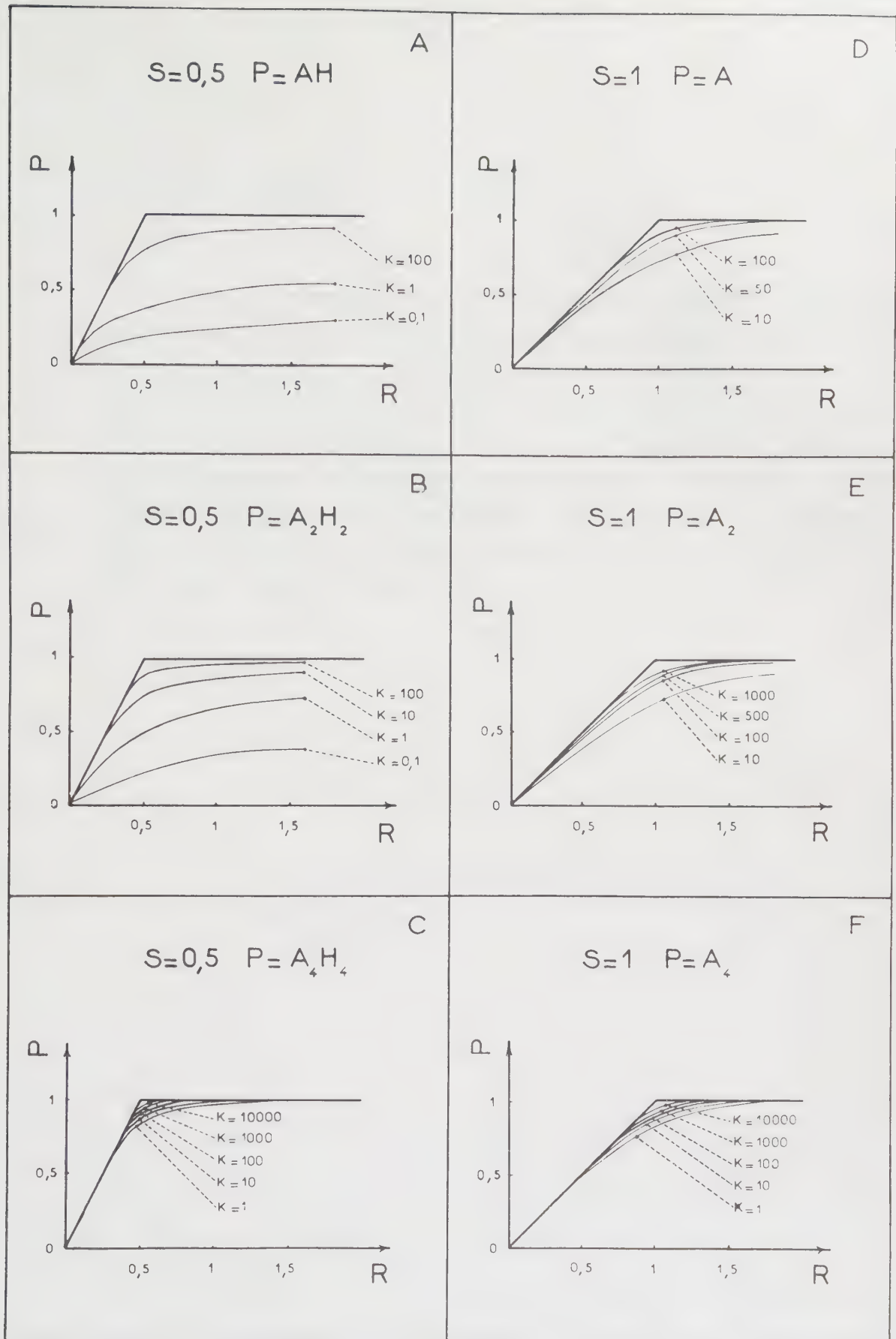


Figure 15

Courbes théoriques de titrage d'un donneur d'électrons
par l'eau oxygénée.

.../...

Figure 15 (suite)

Les courbes de titrage représentent la variation de la concentration à l'équilibre du produit, P, d'oxydation d'un donneur d'électrons AH_2 en fonction du rapport, R, des concentrations initiales en eau oxygénée et en donneur d'électrons ($R = [H_2O_2]_0 / [AH_2]_0$). Elles sont calculées pour plusieurs valeurs de la constante d'équilibre K, en faisant différentes hypothèses sur la valeur du rapport des coefficients de stoechiométrie des réactifs ($S = \text{coef. } H_2O_2 / \text{coef. } AH_2$).

x est donc racine de l'équation du 3ème degré :

$$4 Kx^3 - 4K (2 + h) x^2 + (4K + 8K h + 1) x - 4K h = 0 \quad [13]$$

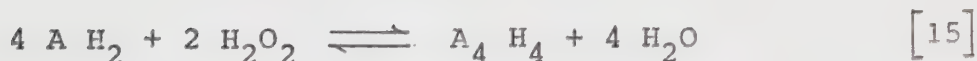
Comme dans le cas précédent, nous avons calculé x par la méthode de NEWTON pour les valeurs de K égales à 100, 10, 1, 0,1, et pour des valeurs de h comprises entre 0 et 3,6. Seules les valeurs de x vérifiant [6] et l'inégalité suivante sont à prendre en considération :

$$x < h \quad [14]$$

La courbe donnant la variation de la concentration x en produit, P, d'oxydation du donneur d'électrons, en fonction du rapport, R, des concentrations initiales en eau oxygénée et en donneur ($R = \frac{h}{2}$) est représentée dans la figure 15 B (page 58).

C. Le produit d'oxydation P est un tétramère du
donneur d'électrons oxydé : $P = A_4 H_4$.

La réaction globale s'écrit :



Supposons que les concentrations initiales en donneur réduit et en eau oxygénée soient respectivement 4 et 2 h (en M). Soit x la concentration du produit, P, de la réaction ($P = A_4 H_4$) à l'équilibre, et K la constante d'équilibre. On a la relation :

$$K = \frac{x}{1024 (1-x)^4 (h-x)^2} \quad [16]$$

x est donc solution de l'équation du 6ème degré :

$$\begin{aligned}
 & 1024 \text{ K h}^2 - [2048 \text{ K h (1+h) + 1}] x + 1024 \text{ K (1+8h+6h}^2) x^2 \\
 & - 4096 \text{ K (h}^2 + 3h + 1) x^3 + 1024 \text{ K (h}^2 + 8h + 6) x^4 \quad [17] \\
 & - 2048 \text{ K (h + 2) x}^5 + 1024 \text{ K x}^6 = 0
 \end{aligned}$$

Seules les valeurs de x vérifiant les deux inégalités [6] et [14] sont à prendre en considération. Le calcul des racines de ce polynôme a été effectué en collaboration avec Messieurs F. BLANC et J.P. REYS, du Centre Universitaire de Marseille-Luminy sur un ordinateur SIRIS 10070 de la C.I.I. du Centre de Calcul de l'Université d'Aix-Marseille.

La détermination des coefficients de ce polynôme a été faite grâce à un programme que nous avons conçu et qui figure dans le "LISTING" * (figure 16, page 61). La méthode de calcul des racines est celle de NEWTON-RAPHSON. Ce calcul est réalisé grâce à l'utilisation du sous programme "POLRT" appartenant à la bibliothèque de programme I.B.M. (122).

La courbe donnant la variation de la concentration x en produit d'oxydation du donneur d'électrons en fonction du rapport, R, des concentrations initiales en eau oxygénée et en donneur ($R = \frac{h}{2}$) est représentée dans la figure 15 C (page 58).

2) Le donneur d'électrons peut échanger deux électrons (N = 2).

A. Le produit d'oxydation P est un monomère du donneur d'électrons oxydé : P = A.

La réaction globale s'écrit

* ou LISTAGE : suite d'instructions de calculs données à l'ordinateur

NAME	TYPE	CLASS	HEX	LOC	HEX	LOC	NAME	TYPE	CLASS	HEX	LOC	NAME	TYPE	CLASS	HEX	LOC
ALPHA	D	SCALR	00026	V	2		COP	D	ARRAY	*00038	V	DABS	D	SP430	1	00015
PI	D	SCALR	00020	V	2		CV	D	SCALR	00022	V	FI	D	SCALR	00034	V
IFIT	I	SCALR	00032	V	1		ICT	I	SCALR	00051	V	IER	I	SCALR	00030	V
KJ1	I	SCALR	00028	V	1		IN	I	SCALR	00050	V	ITEMP	I	SCALR	00034	V
KT	I	SCALR	00020	V	1		L	I	SCALR	00025	V	K	I	SCALR	00039	V
MY	I	SCALR	0002F	V	1		LR	I	SCALR	00029	V	PK	I	SCALR	00024	V
EX	I	SCALR	00028	V	1		NR	I	SCALR	0002C	V	PLK1	I	SP130	1	00011
POLRT	D	SCALR	00000	V	2		ROOT1	D	ARRAY	*00038	V	ROOT4	D	ARRAY	*00031	V
SUN30	D	SCALR	0001E	V	2		TEMP	D	SCALR	00024	V	J	D	SCALR	00018	V
IR	D	SCALR	0000E	V	2		JY	D	SCALR	00010	V	K	D	SCALR	00012	V
X	D	SCALR	00006	V	2		XC38	D	SCALR	00017	V	K3	D	SCALR	00012	V
XPR	D	SCALR	0000A	V	2		XT	D	SCALR	00016	V	KT2	D	SCALR	00013	V
V	D	SCALR	00008	V	2		YC	D	SCALR	00014	V	YPA	D	SCALR	00011	V
VY	D	SCALR	00014	V	2		YF2	D	SCALR	0001C	V					

LABEL	HEX	LOC	LABEL	HEX	LOC	LABEL	HEX	LOC	LABEL	HEX	LOC	LABEL	HEX	LOC	LABEL	HEX	LOC
10	00017	15	00019	20	00018	25	0001C	30	0001F	32	00022	35	00025	40	00035	45	0003C
40	00054	45	00084	50	00099	55	00042	60	00037	65	00034	70	00038	75	00038	80	00038
85	000C9	90	000C8	95	000C8	100	00031	105	00030	110	00030	115	000EE	120	000F7	125	000F4
130	00111	135	00117	140	00119	145	0012V	150	00132	155	00132	160	00132	165	00134	170	00134

LOCAL VARIABLES (33 WORDS):

00000 POLRT	00002 XJ	00004 YC	00006 X	00008 Y1	00010 X4
0000C YPR	0000F XJ	00010 YV	00012 X	00014 Y1	00016 X1
00018 U	0001A XT2	0001C YF2	0001E X444	00020 XA	00022 X1
00024 TEMP	00026 ALPHA	00028 KJ1	0002A X	0002C XA	0002E X1
00030 K2	00032 KJ1	00034 FI	00036 ITEM	00038 X1	0003A X1

BLANK COMMON (0 WORDS):

ENTRY POINTS:

00000 POLRT

INTRINSIC SUBPROGRAMS USED:

DABS

EXTERNAL SUBPROGRAMS REQUIRED:

FI108 V110D V2070N

HIGHEST ERROR SEVERITY: 0 (NO ERRORS)

DEC	HEX
WORDS	WORDS
-----	-----
GENERATED CODE: 315	00138
CONSTANTS: 15	0000F
LOCAL VARIABLES: 55	00037
TEMPS: 9	00002
TOTAL PROGRAM: 394	00184

JOB STEP 01 TERMINATED AFTER 0000.00 MIN

CORE USED 1049 DISC USED 0024 WAIT TIME 0000.10

ILINE

Figure 16 (suite)

Listing de l'ordinateur Siris 10070.

Ce listing a permis d'établir les courbes théoriques de titrage représentées dans les schémas C et F de la figure 15 (page 58).



Supposons que les concentrations initiales en donneur réduit et en eau oxygénée soient respectivement 1 et h. Soit x la concentration du produit, P, de la réaction ($P = A$) à l'équilibre et K la constante d'équilibre. On a la relation :

$$K = \frac{x}{(1 - x)(h - x)} \quad [19]$$

x est donc racine de l'équation du 2ème degré :

$$K x^2 - [K(h+1) + 1] x + K h = 0 \quad [20]$$

On montrerait facilement que la seule racine vérifiant à la fois [6], [20] et [14] est

$$x = \frac{K(h+1) + 1 - \sqrt{[K(h+1) + 1]^2 - 4 K^2 h}}{2 K}$$

La courbe donnant la variation de la concentration x en produit, P, d'oxydation du donneur d'électrons en fonction du rapport, R, des concentrations initiales en eau oxygénée et en donneur ($R = \frac{h}{1} = h$) est représentée dans la figure 15 D (page 58).

B. Le produit d'oxydation P est un dimère du donneur d'électrons oxydé : ($P = A_2$).

La réaction globale s'écrit :



Supposons que les concentrations initiales en donneur réduit et en eau oxygénée soient respectivement 2 et 2 h. Soit x la concentration du produit, P, de la réaction ($P = A_2$) à l'équilibre et K la constante d'équilibre. On a la relation :

$$K = \frac{x}{16 (1-x)^2 (h-x)^2} \quad [22]$$

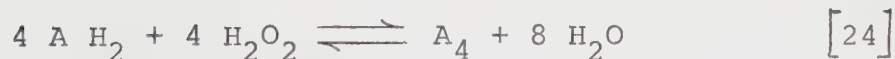
x est donc solution de l'équation du 4ème degré :

$$16Kx^4 - 32K(1+h)x^3 + 16K(h^2+4h+1)x^2 - [32Kh(h+1)+1]x + 16Kh^2 = 0 \quad [23]$$

Les seules valeurs de x à prendre en considération sont celles qui vérifient les inéquations [6] et [14]. La courbe donnant la variation de la concentration x du produit, P, d'oxydation du donneur d'électrons en fonction du rapport, R, des concentrations initiales en eau oxygénée et en donneur ($R = \frac{2h}{2} = h$) est représentée dans la figure 15 E (page 58).

C. Le produit d'oxydation P est un tétramère du donneur d'électrons oxydé : $P = A_4$.

La réaction globale s'écrit :



Supposons que les concentrations initiales en donneur réduit et en eau oxygénée soient respectivement 4 et 4 h. Soit x la concentration du produit, P, de la réaction ($P = A_4$) à l'équilibre et K la constante d'équilibre. On a la relation :

$$K = \frac{x}{4^{16} (1-x)^4 (h-x)^4} \quad [25]$$

x est donc solution de l'équation du 8ème degré :

$$\begin{aligned} & 65536 Kh^4 - [262144 Kh^3 (1+h) + 1] x + 131072 Kh^2 (3+8h+3h^2) x^2 \\ & - 262144 Kh (1+6h+6h^2+h^3) x^3 + 65536 K(1+16h+36h^2+16h^3+h^4) x^4 \\ & - 262144 K (1+6h+6h^2+h^3) x^5 + 131072 K (3+8h+3h^2) x^6 \\ & - 262144 K (1+h) x^7 + 65536 Kx^8 = 0 \end{aligned} \quad [26]$$

Les seules valeurs de x à prendre en considération sont celles qui vérifient les inéquations [6] et [14]. Elles ont été calculées par la méthode de calcul numérique indiquée précédemment (page 60). Dans ce cas, le programme permettant de déterminer les coefficients du polynôme en fonction de h est différent (voir LISTING, figure 16, page 61). La courbe donnant la variation de la concentration x en produit d'oxydation, P, du donneur d'électrons en fonction du rapport, R, des concentrations initiales en eau oxygénée et en donneur ($R = \frac{h}{2}$) est représentée dans la figure 15 F (page 58).

La figure 15 (page 58) montre que, pour une valeur de la constante d'équilibre K supérieure à 10, les courbes de titrage présentent une cassure. Lorsque le nombre d'électrons cédés par le donneur est de 1 ($N=1$), quelle que soit la nature du produit d'oxydation (P monomère ou polymère), la cassure se situe dans la région où $R = 0,5$ à $0,7$, tandis que lorsque le nombre d'électrons cédés par le donneur est de 2, la cassure se situe dans la région où $R = 1$ à $1,4$.

L'existence de cassures dans les courbes de titrage avait déjà été observée expérimentalement par YOE et JONES (123) mais n'avait jamais été retrouvée par le calcul numérique. Dans le cas favorable où la constante d'équilibre est relativement grande, la position de cette cassure peut être déterminée avec précision et permet donc de connaître le rapport des coefficients de stoechiométrie des réactifs. Dans le cas d'une réaction d'oxydo-réduction, si l'on connaît le nombre d'électrons que peut échanger l'oxydant, on peut en déduire le nombre d'électrons cédés par le réducteur.

Ces résultats seront appliqués ultérieurement (chapitres IV et V) à l'étude de l'oxydation du gaïacol et du ferrocyclochrome c.

CHAPITRE III

ISOLEMENT, PURIFICATION ET CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'ISOPEROXYDASE P_2 DE RAIFORT.

Dans ce chapitre, nous décrivons l'isolement, la purification et quelques caractéristiques physico-chimiques de l'isoperoxydase P_2 , constituant majeur des préparations commerciales de peroxydases de Raifort (*Armoracia Cochlearia*).

I. Isolement et purification.

1) Composants de la préparation commerciale.

La figure 17 (page 67) représente le profil d'électrophorèse d'une préparation commerciale fournie par les Etablissements Fluka. Les résultats sont reproductibles sur plus de dix lots différents et montrent que la préparation commerciale contient cinq peroxydases. A pH 6,8, une peroxydase est anodique (acide) : P_1 ; les quatre autres sont cathodiques (basiques) : P_2 , P_3 , P_4 , P_5 .

2) Séparation des peroxydases acides et basiques.

On obtient cette séparation par chromatographie sur un échangeur d'ions. L'homogénat H est déposé sur une colonne de C.M. Sephadex C-50 équilibré avec le tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 6,8. A l'élution, effectuée par le même tampon (figure 18 A, page 68), deux pics sont obtenus. Le premier correspond au mélange des peroxydases P_1 (acide) et P_2 (légèrement basique); le second, au mélange des peroxydases basiques P_2 , P_3 et P_4 (figure 18 A', p.68).

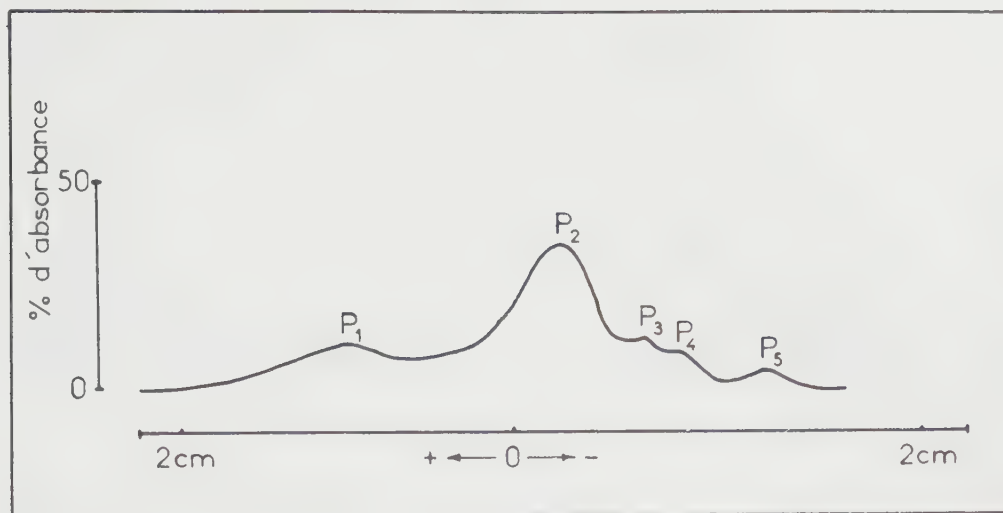


Figure 17

Profil d'électrophorèse de la peroxydase de Raifort commerciale Fluka.

Les électrophorèses sont effectuées à 4° pendant 90 minutes dans un tampon phosphate d'ammonium 0,05 M, pH 6,8.

L'activité peroxydasique est révélée par la benzidine.

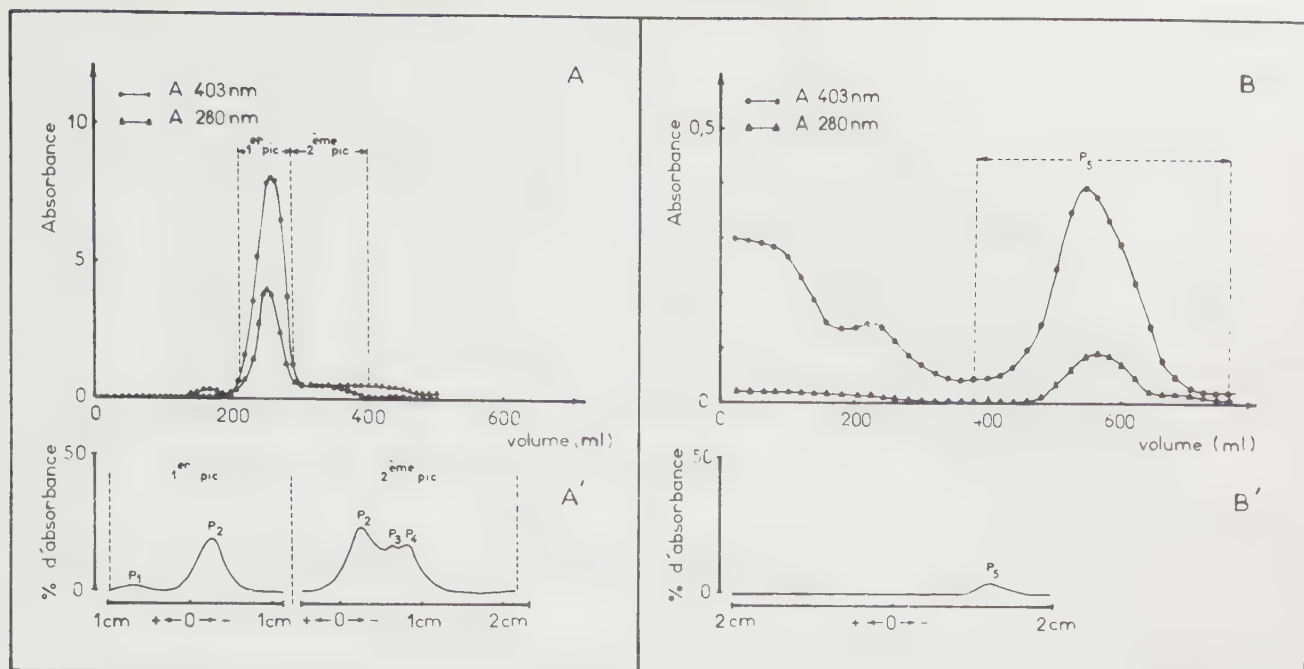


Figure 18

Chromatographie sur CM-Sephadex C-50 de la peroxydase de Raifort commerciale Fluka.

- A. On a déposé sur la colonne (4 cm x 48 cm), 30 ml de tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 6,8, contenant 500 mg de peroxydase commerciale Fluka. Le volume de chaque fraction est de 5 ml; la vitesse d'écoulement est de 18 ml/h. Le gel est équilibré avec le même tampon qui permet d'éluer les deux premiers pics.
- B. L'élution du troisième pic est conduite avec un tampon phosphate de sodium 0,33 M, pH 6,8.

Après élution des quatre peroxydases, une bande brune reste au sommet de la colonne de gel. L'élution est alors conduite avec un tampon phosphate de sodium 0,33 M, pH 6,8 (figure 18 B, page 68). On obtient la peroxydase P_5 (figure 18 B', page 68). Le fait que l'homogénat H et les différentes fractions renferment les mêmes peroxydases, laisse supposer que la technique chromatographique n'a pas entraîné la formation d'artéfacts.

3) Séparation des peroxydases P_1 et P_2

La solution contenant les peroxydases P_1 et P_2 (1er pic de la chromatographie de la figure 18 A, page 68) est lyophilisée. La poudre obtenue est mise en solution dans l'eau distillée, et la solution est dialysée contre un tampon citrate-phosphate 0,01 M, pH 5,0. Après dialyse, la solution obtenue est chromatographiée sur une colonne de DEAE-Sephadex A-50 équilibré avec le même tampon, qui est également utilisé pour l'élution.

A l'élution, on obtient deux pics (figure 19 A, page 70). Le premier correspond à la peroxydase légèrement basique P_2 , le second à la peroxydase P_1 (figure 19 A', page 70).

4) Purification ultérieure de la peroxydase P_2 par tamisage moléculaire.

Le R.Z. de la solution de peroxydase P_2 (1er pic de la chromatographie de la figure 19 A, page 70) étant relativement faible, il est augmenté par un tamisage moléculaire. Pour cela, la solution est lyophilisée, remise en suspension dans l'eau, dialysée contre un tampon acétate de sodium 0,1 M, pH 6,8 et chromatographiée sur une colonne

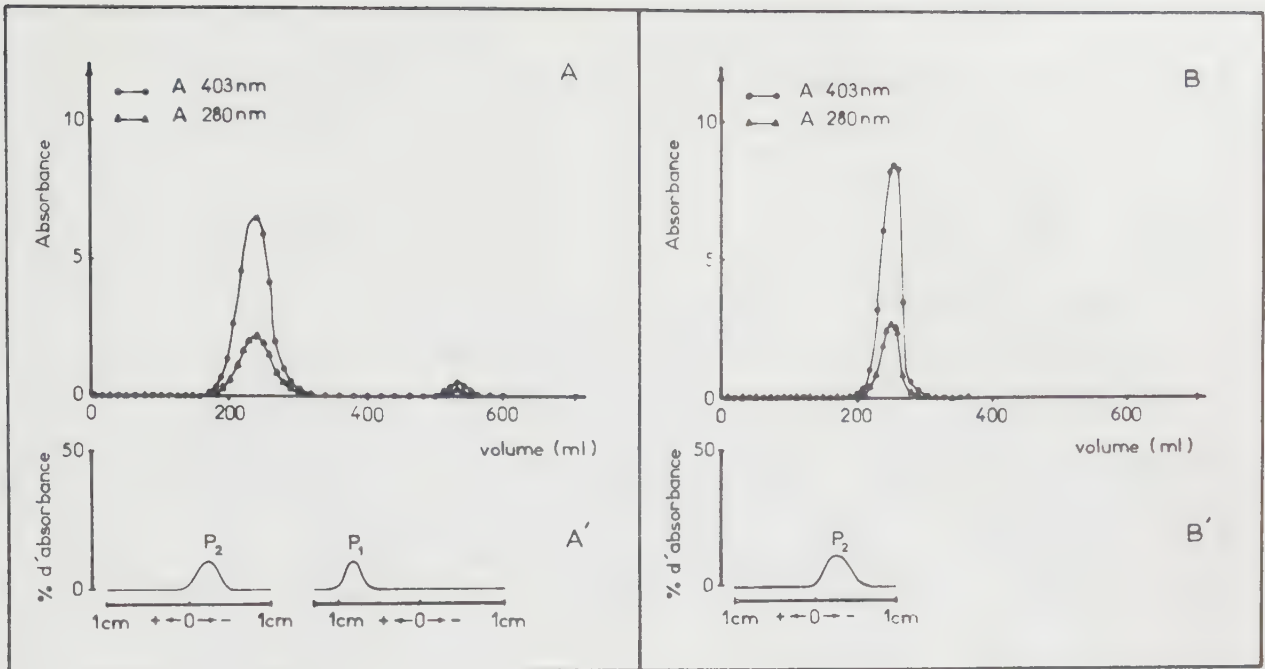


Figure 19

Séparation chromatographique sur DEAE-Sephadex A-50 des isoperoxydases P_1 et P_2 et purification sur Sephadex G-100 de l'isoperoxydase P_2 .

- A. On a déposé sur la colonne (4 cm x 48 cm) 10 ml du mélange des deux peroxydases (29,5 mg de protéine par ml). Le volume de chaque fraction est de 5 ml; la vitesse d'écoulement est de 12,5 ml/h. Le gel est équilibré avec un tampon citrate-phosphate 0,01 M, pH 5. L'élution est conduite avec le même tampon.
- B. On a déposé sur la colonne (2,5 cm x 83 cm) 12 ml d'une solution de peroxydase P_2 (14 mg de protéine par ml). Le volume de chaque fraction est de 5 ml; la vitesse d'écoulement est de 12,5 ml/h. Les colonnes sont équilibrées avec un tampon acétate de sodium 0,1 M, pH 6,8.

de Sephadex G-100 équilibré avec le même tampon (figure 19 B , page 70).

5) Conclusions.

L'ensemble du processus d'isolement et de purification est représenté dans le tableau III, page 72) La peroxydase P_2 est obtenue avec un R.Z. voisin de 3,0. Une électrophorèse avec révélation de l'activité peroxydasique (benzidine) et des protéines (noir amido), effectuée sur deux bandes distinctes, montre l'existence d'une seule tache sur chaque bande. De plus, la distance de migration est la même pour les deux taches : la protéine unique mise en évidence est donc une peroxydase.

L'étude comparée, des activités des différentes peroxydases, fournie par le tableau III, page 72 , permet de dire sans ambiguïté que la peroxydase P_2 est le constituant majeur de l'homogénat commercial.

Nos résultats sont en accord avec ceux de JERMYN et THOMAS (5) qui trouvent également cinq composants dans H R P. La prépondérance de la peroxydase P_2 permet de l'assimiler aux peroxydases désignées par :

- . A_1 (JERMYN et THOMAS (5))
- . III (KLAPPER et HACKETT (8))
- . C (SHANNON et Coll. (9))

Le nombre relativement réduit d'isoenzymes obtenus, peut s'expliquer par l'élimination des isoenzymes les plus acides (mis en évidence par SHANNON et Coll. (9)) par les procédés de purification Fluka. Les mêmes constatations ont été faites sur les procédés Worthington et Calbiochem par KASINSKY et HACKETT en 1968 (7).

	masse de protéine(2) (mg)	molarité du tampon (M)	R.Z. (3)	isozymes	activité enzyma- tique(4) (u.e)	masse de protéine(5) (mg)	activité spécifi- que (6) (u.e/mg)	rendement(7) (%)
Peroxydase de Raifort commer- ciale Fluka (1)	500		1,06	P ¹ P ² P ³ P ⁴ P ⁵	44 500	44 500	99	100
					32 350			
C M-Sephadex C-50		0,1 (1er pic)	1,80	P ¹ P ²	1 087	34 362	116	77
		0,1 (2ème pic)	0,75	P ² P ³ P ⁴				
		0,33	0,23	P ⁵	925			
DEAE-Sephadex A-50		0,01 (1er pic)	2,40	P ²	28 500	28 682	173	64,5
		0,01 (2ème pic)	1,40	P ¹	182			
Sephadex G-100	155	0,1	2,92	P ²	22 000	22 000	191	49,5

Tableau III

Tableau III (suite)

Schéma de la méthode d'isolement et de purification de la peroxydase P_2 de Raifort à partir d'une préparation commerciale Fluka.

- (1) Lots N° 505499 et 484852
- (2) Masse déterminée par pesée
- (3) R.Z. : A 403 nm/A 280 nm
- (4) Unité enzymatique (u.e) : conventionnellement, elle correspond à une augmentation d'absorbance à 470 nm d'une unité par minute. Cette augmentation doit être obtenue dans les conditions expérimentales suivantes : 0,6 ml de la solution de peroxydase à tester injecté dans 5,4 ml de tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 6,8 contenant du galacol et de l'eau oxygénée aux concentrations $5 \cdot 10^{-4}$ M.
- (5) Masse déterminée par la mesure de l'absorbance à 280 nm; on admet qu'une solution dont l'absorbance est égale à l'unité contient 1 mg de protéine par ml.
- (6) Activité spécifique : Activité enzymatique / Masse de protéine en mg⁽⁵⁾.
- (7) Rendement : Activité enzymatique de l'étape de purification considérée / Activité initiale.

II. Caractéristiques physico-chimiques de l'isoperoxydase P₂.

1) Vitesse de migration électrophorétique.

La mesure des vitesses de migration a donné les résultats portés dans le tableau IV, page 74 . Ces résultats montrent que la peroxydase P₁ est très acide, la peroxydase P₂ est légèrement basique, les peroxydases P₃, P₄ et P₅ sont très basiques.

2) Caractéristiques hydrodynamiques.

A. Constante de sédimentation.

La valeur de $S_{20,w}^0$ est obtenue par extrapolation à concentration nulle, de la variation de $S_{20,w}^C$ en fonction de la concentration protéique C déterminée dans une marge comprise entre 2 et 6 mg/ml (figure 20, page 75). Pour diminuer les effets dus à la charge des protéines, le pH du solvant utilisé est fixé à la valeur 6,8 (tampon phosphate de sodium 0,1 M) voisine du point isoélectrique.

Les diagrammes Schlieren obtenus sont portés dans la figure 21 (page 76). Ces diagrammes montrent que la préparation de P₂ est homogène.

Le tableau V, page 77 , rassemble les principaux résultats obtenus.

B. Masse moléculaire.

- Le contenu hématinique de l'enzyme lyophilisé déterminé par la méthode du pyridine-hémochromogène (10) permet d'obtenir une masse moléculaire moyenne, calculée sur trois essais, de 41 700.

Peroxydases	Vitesses de migration (mm/h)
P ₁	- 20
P ₂	+ 9,3
P ₃	+ 22,6
P ₄	+ 26,6
P ₅	+ 40

Tableau IV

Vitesse de migration électrophorétique des peroxydases de Raifort.

Les migrations vers l'anode sont comptées négativement; vers la cathode, elles sont comptées positivement.

Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles indiquées dans la figure 17 (page 67).

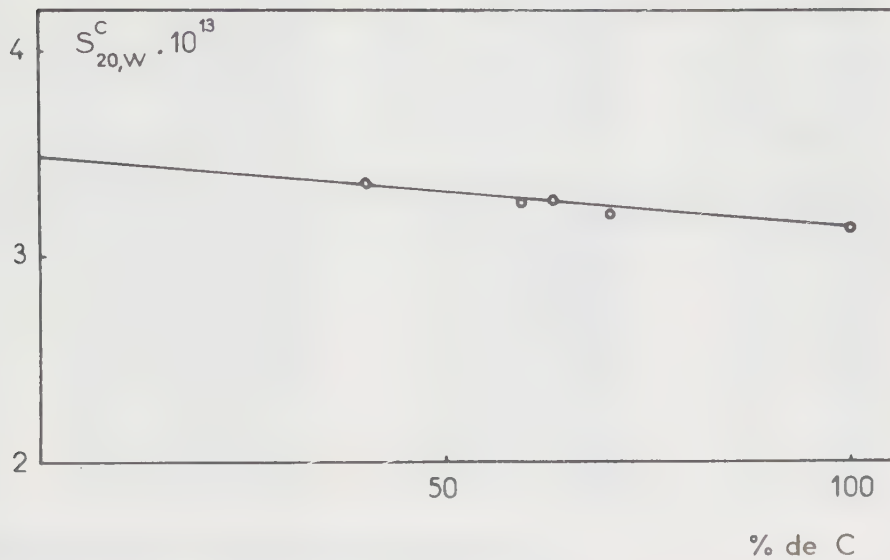


Figure 20

Détermination de $S_{20,w}^0$ par extrapolation graphique
à concentration nulle de la fonction $S_{20,w}^C = f(c)$

Peroxydase P_2 ; tampon phosphate de sodium 0,1 M,
pH 6,8.

C = 6 mg de protéine/ml

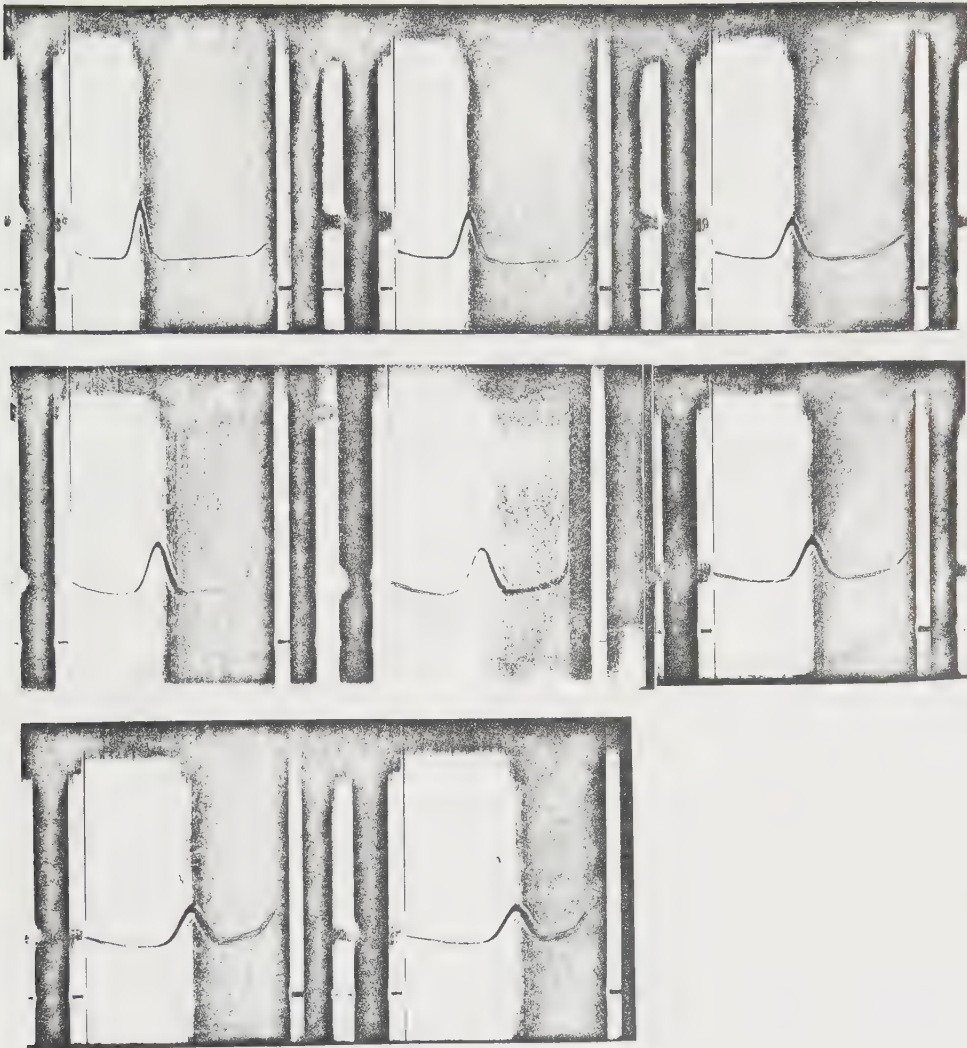


Figure 21

Diagrammes d'ultracentrifugation de l'isoperoxydase P_2 de Raifort.

Isoperoxydase P_2 (6 mg/ml); tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 6,8.

La migration s'effectue de gauche à droite; les clichés sont enregistrés toutes les 8 minutes.

Vitesse de rotation : 59 780 tours / mn; angle de barre 70° ; température 20° .

$S_{20,w}^0 \cdot 10^{13}$	Masse moléculaire		
	Pesée (a)	Filtration moléculaire (b)	Ultracentrifugation (c)
3,48	41 700	51 000	43 000

Tableau V

Caractéristiques hydrodynamiques de la peroxydase
P₂ de Raifort.

a : ±2000

b : ±3000

c : ±2500

- La filtration moléculaire, en adoptant le système de représentation proposé par WHITAKER (28), fournit la valeur de 51 000 (figure 22, page 79).

- La détermination de la masse moléculaire par ultracentrifugation analytique est effectuée avec une solution de peroxydase P_2 à 6 mg/ml, dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 6,8, dont la densité est égale à 1,0677. Le volume spécifique partiel est supposé égal à 0,73 ml/g. La concentration de la peroxydase est mesurée avec le système interférométrique de RAYLEIGH. La valeur de 43 000 est obtenue par cette méthode.

La détermination par tamisage moléculaire ne fournit pas les mêmes valeurs que par ultracentrifugation analytique et par pesée. La technique de tamisage moléculaire a déjà été signalée par divers auteurs, notamment WHITAKER (28), ANDREWS (124), WARD et ARNOFF (125) et MAZZA (126), comme étant souvent non satisfaisante dans le cas des glycoprotéines.

La valeur de 43 000 a donc été utilisée dans la suite de notre travail.

3) Composition en amino-acides.

La composition en amino-acides, exprimée en nombre de résidus, est portée dans le tableau VI, page 80. A partir des pourcentages en grammes, on détermine les nombres de résidus correspondants en tenant compte de la masse moléculaire de la fraction protéique de la molécule. Celle-ci est égale à la masse moléculaire de la peroxydase, déterminée par ultracentrifugation (43 000), diminuée de la masse de l'hème et de celle des sucres dont le pourcentage est de 18%. Les valeurs des nombres

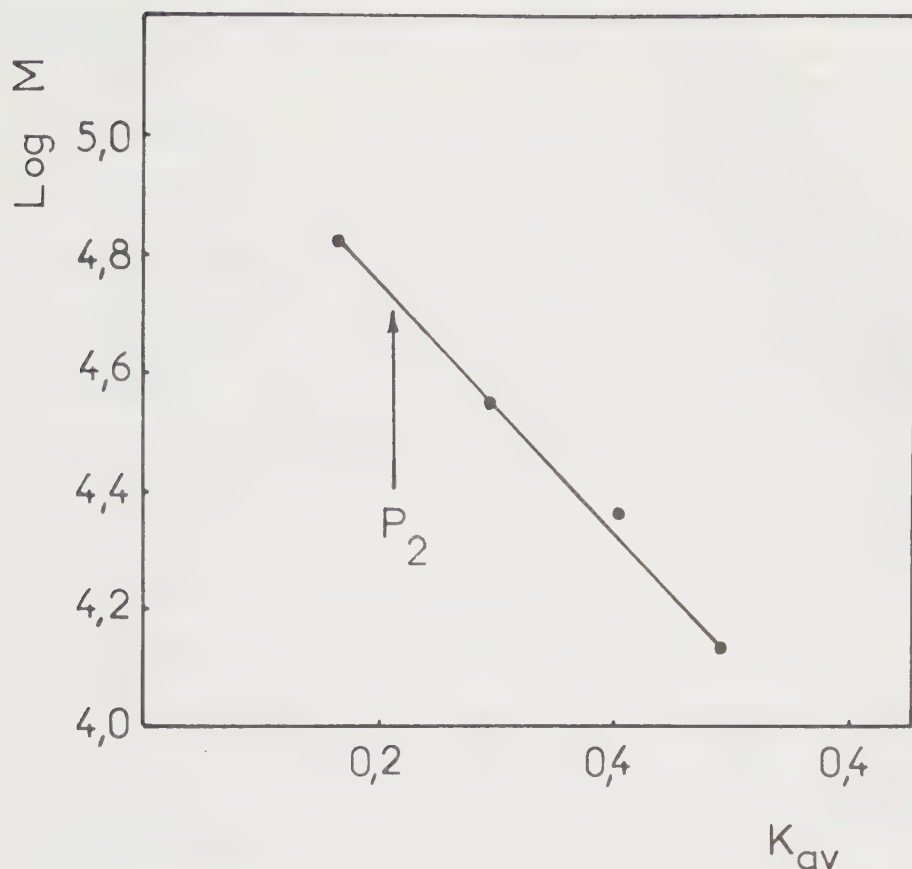


Figure 22

Détermination de la masse moléculaire de la peroxydase P₂ de Raifort par tamisage moléculaire sur Sephadex G-100.

Le volume mort, V_0 , de la colonne est déterminé à l'aide du bleu dextran (2 mg/0,5 ml). Les protéines de référence sont utilisées à la concentration de 1% (5 mg/0,5 ml). Dimensions de la colonne : 1,1 cm x 160 cm. Tampon acétate de sodium 0,1 M, pH 6,0, NaCl 0,4 M.

	Nombre de résidus par molécule de peroxydase
Lysine	6
Histidine	3
Arginine	20
Acide Aspartique	50
Thréonine	24
Sérine	22
Acide glutamique	21
Proline	16
Glycine	16
Alanine	24
1/2 Cystine	8
Valine	16
Méthionine	4
Isoleucine	14
Leucine	38
Tyrosine	5
Phénylalanine	22
Masse moléculaire par la composition des amino-acides	42 850
Masse moléculaire par ultracentrifugation	43 000

Tableau VI

Composition en amino-acides de l'isoperoxydase P₂ de
Raifort.

de résidus sont obtenues à partir de l'hypothèse de calcul selon laquelle

$$\text{Tyr} = 5$$

La composition de la peroxydase P_2 ainsi obtenue est voisine de celle donnée par SHANNON et Coll. (9) pour l'isoperoxydase C. Il faut cependant noter que nous trouvons un nombre de demi-cystines, huit, beaucoup plus important que celui, quatre, trouvé par ces auteurs (tableau II, page 14). Ces résultats sont en accord avec ceux de WELINDER et Coll. (35) et de BRILL et Coll. (39) qui trouvent respectivement huit et six à huit demi-cystines.

4) Caractéristiques spectrales.

Le spectre d'absorption de l'isoperoxydase P_2 est déterminé à l'état oxydé. Il est représenté dans la figure 23, page 82. La bande γ est située à 403 nm. Le spectre fait également apparaître les bandes D et E respectivement situées à 639 nm et 500 nm, qui sont, d'après la classification de YAMAZAKI et Coll. (127), les caractéristiques spectrales typiques de composés "high spin".

Le spectre du pyridine hémochromogène de cette peroxydase est identique au spectre du pyridine hémochromogène de la protohématine IX : bande α à 556 nm, bande β à 526 nm, bande γ à 420 nm. Cette peroxydase possède donc la protohématine IX comme groupement prosthétique. L'analogie signalée plus haut, entre la peroxydase P_2 et l'isoenzyme C isolé par SHANNON et Coll. (9) est confirmée par le fait que les deux peroxydases présentent un épaulement à 376 nm, indépendamment des bandes γ , D, E.

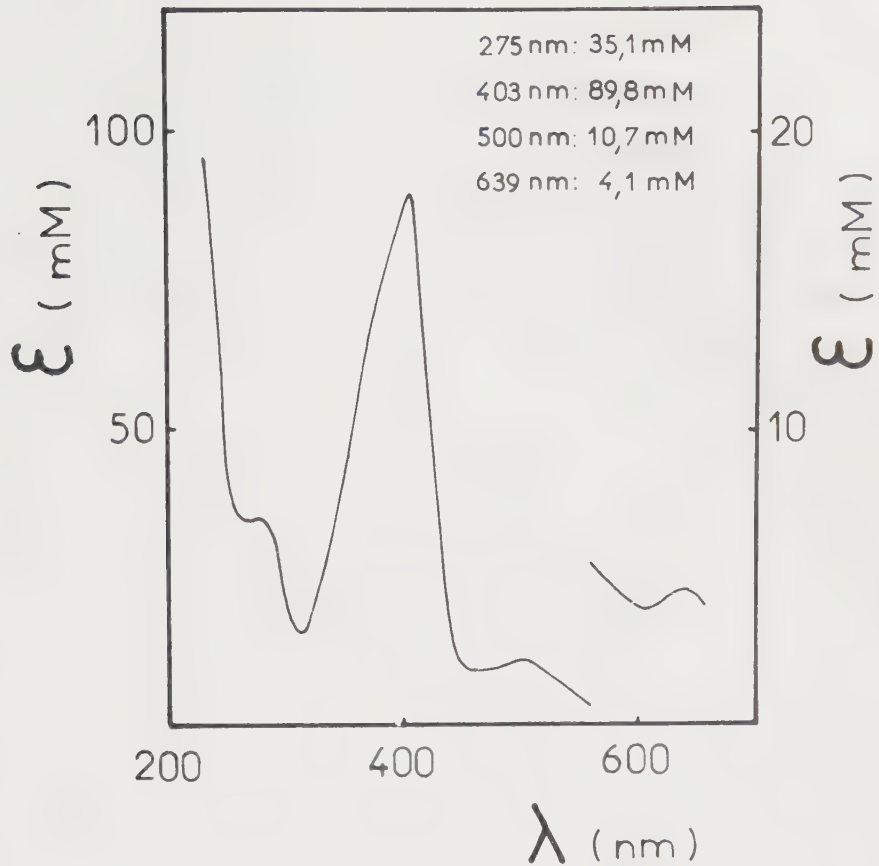


Figure 23

Spectre d'absorption de la peroxydase P_2 de Raifort.

Le spectre est enregistré dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 6,8. Les valeurs indiquées dans le tableau représentent la longueur d'onde des pics ou épaulements et l'extinction millimolaire correspondante.

Ces auteurs obtiennent d'autre part une valeur de constante de sédimentation $S_{20,w}^0$ de 3,58, voisine de celle de l'isoperoxydase P_2 , 3,50. De plus, l'isoenzyme C est celui dont l'activité dans leur mélange est maximum. Ces similitudes permettent de penser que l'isoenzyme P_2 correspond à l'isoenzyme C isolé par SHANNON.

CHAPITRE IV

ETUDE DE L'OXYDATION DU GAÏACOL PAR L'ISOPEROXYDASE P₂ DE RAIFORT.

Le gaïacol a été l'un des donneurs d'électrons le plus utilisé dans l'étude cinétique des réactions d'oxydation catalysées par les peroxydases.

On pourrait donc penser que les nombreux travaux publiés sur la question (48,54,57,81) ont conduit à un modèle réactionnel clairement établi. L'analyse détaillée des interprétations proposées montre qu'il n'en est rien. La cause de cet état de fait est simple.

En premier lieu, tous les auteurs ont omis de déterminer la stoechiométrie de la réaction, et ont admis, par analogie avec d'autres donneurs, que la molécule d'eau oxygénée oxyde obligatoirement deux molécules de gaïacol. Or nous verrons, dans le travail qui va suivre, qu'une seule molécule est en réalité oxydée. Tous les modèles réactionnels proposés jusqu'à présent pour expliquer l'oxydation du gaïacol ne correspondent pas, en conséquence, à la réalité et doivent être éliminés.

Par ailleurs, il résulte de la remarque précédente que la connaissance du produit formé au cours de la réaction, contrairement à l'opinion générale des chercheurs qui s'y sont intéressés, est également très importante. Elle est indispensable pour déterminer la stoechiométrie de la réaction, et par là même, le mécanisme réactionnel. C'est donc par la détermination

de la nature de ce produit que doit commencer toute analyse.

Enfin, la plupart des travaux effectués jusqu'à ce jour sur les mécanismes des réactions d'oxydation catalysées par les peroxydases ont été effectués sur des mélanges d'isoperoxydases.

C'est en tenant compte de ces trois observations critiques que nous avons entrepris l'étude cinétique de l'oxydation du gaïacol par l'isoperoxydase P_2 de raifort.

I . Etude du produit d'oxydation

1) Préparation du produit d'oxydation du gaïacol

Parmi les différentes techniques que nous avons utilisées pour étudier le produit de l'oxydation du gaïacol par l'eau oxygénée en présence de peroxydase, certaines d'entre elles nécessitent l'utilisation d'un échantillon de produit dépourvu de traces d'eau. Pour cela le produit est extrait de son milieu réactionnel aqueux à l'aide d'un solvant organique. L'étude spectrophotométrique effectuée plus loin révélera que ce produit évolue à la lumière ; aussi utiliserons nous deux méthodes de préparation.

A . Préparation à la lumière du produit d'oxydation à l'état solide.

20 ml de peroxydase $1,39 \cdot 10^{-6}$ M sont introduits dans un mélange contenant 150 ml de tampon phosphate de sodium pH 7,0,05 M, 90 ml d'eau, 30 ml d'une solution aqueuse de gaïacol 10^{-2} M, 30 ml d'eau oxygénée $2 \cdot 10^{-2}$ M. Dans ces conditions, la concentration dans le milieu réactionnel du gaïacol est $9,36 \cdot 10^{-4}$ M et le rapport $R = [H_2 O_2] / [gaïacol] = 2$. Dix minutes après le début de la réaction, le produit coloré est extrait avec 200 ml de chloroforme (4 extractions successives avec 50 ml). Les traces d'eau sont éliminées par l'addition

de 50 g. de Na_2SO_4 anhydre et agitation du mélange pendant 10 minutes. Après décantation et élimination du sulfate de sodium, l'extrait est évaporé à sec sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif. Toutes ces opérations sont effectuées à la lumière.

Au cours de l'étude spectrophotométrique dans le visible et le proche ultra-violet qui sera réalisée plus loin, ce produit sera appelé : " P_L ".

B . Préparation à l'obscurité et en solution dans un solvant organique du produit d'oxydation

Le milieu réactionnel est le même que celui décrit dans le paragraphe ci-dessus. Le produit d'oxydation est extrait du milieu aqueux avec un solvant organique (C Cl_4 , CS_2 , C H Cl_3^*). Les traces d'eau sont éliminées par addition du sulfate de sodium anhydre. Après décantation et élimination du sulfate de sodium , l'extrait est partiellement évaporé afin d'augmenter la concentration du produit dissous. Toutes ces opérations sont réalisées à l'obscurité.

Au cours de l'étude spectrophotométrique ultérieure, dans le visible et le proche ultra violet, ce produit sera appelé " P ".

* Le produit d'oxydation du gaïacol est relativement moins soluble dans les solvants organiques que dans l'eau. Il semble que le meilleur solvant d'extraction soit le chloroforme mais la très forte absorption dans certaines région du spectre infra-rouge de ce solvant nous a amené à en utiliser d'autres.

C. Test d'homogénéité du produit : chromatographie sur couche mince.

La chromatographie sur couche mince est effectuée sur le produit préparé à la lumière, à l'état solide, que l'on redissout dans le chloroforme. Différents solvants de polarités croissantes sont essayés comme éluants.

Aucune migration de la tache sur la plaque (gel de silice) ne peut être observée en lumière ultra-violette avec le benzène, le cyclohexane et le chloroforme comme éluants. Par contre, avec l'acétone, la migration de la tache suit le front du solvant : celui-ci est donc trop polaire. Avec le mélange acétone 80 - cyclohexane 20, la forme de la tache indique que ce mélange est encore trop polaire. L'acétate d'éthyle est un éluant convenable, il provoque en effet une migration de la tache qui est retardée par rapport au front du solvant. L'examen de la plaque en lumière ultra-violette permet d'observer une tache suivie d'une trainée. Une chromatographie comparative est effectuée avec le gaïacol et avec l'acétate d'éthyle comme éluant : le gaïacol migre en suivant le front du solvant.

Nous verrons, dans la suite de cet exposé, que les structures des formules possibles du (ou des) produit(s) d'oxydation du gaïacol sont celles de produits oxygénés soit sous forme hydroxyle, soit sous forme cétonique, ou encore sous forme éther. Ces produits sont difficilement analysables par chromatographie sur plaque. Néanmoins, il semble que parmi les produits obtenus, l'un de ceux-ci soit prépondérant dans le mélange réactionnel.

2) Courbe de titrage du gaïacol par l'eau oxygénée
en présence de l'isoperoxydase P₂ de Raifort.

Le spectre d'absorption du produit d'oxydation du gaïacol (courbe 1 de la figure 25 A, page 91) présente un pic à 470 nm. La courbe de titrage peut donc être tracée en mesurant à l'équilibre la variation de l'absorbance à 470 nm en fonction du rapport R des concentrations totales en eau oxygénée et gaïacol ($R = [H_2O_2] / [Gaïacol]$) introduites dans le milieu réactionnel. Cette courbe, représentée dans la figure 24 , page 89 , montre que lorsque R croît de 0 à 1,4, l'absorbance croît également de 0 à 0,560 et se maintient à cette valeur pour R supérieur à 1,4. Cette valeur maximale de l'absorbance permet de déterminer le coefficient d'extinction moléculaire du produit coloré formé $\mathcal{P}$ soit

$$\epsilon_{470 \text{ nm}} = 5,6 \cdot 10^3 \cdot M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} *$$

(pour une mole de gaïacol oxydé par litre)

La courbe expérimentale de titrage (figure 24, page 89) présente, comme les courbes théoriques de titrage D, E, F de la figure 15 (page 58), une cassure dans la région où $R = 1$ à 1,4. Cette courbe expérimentale peut se superposer, avec une bonne approximation, à l'une des courbes de chacun des faisceaux représentés dans les schémas D, E et F de la figure 15 (page 58).

* Cette valeur est en accord avec celle fournie par HOSOYA (89) qui trouve $5,57 \cdot 10^3 \cdot M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Elle est cependant plus faible que celle calculée à partir des données expérimentales, à pH 5,4, de GEORGE (128) : $6,67 \cdot 10^3 \cdot M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

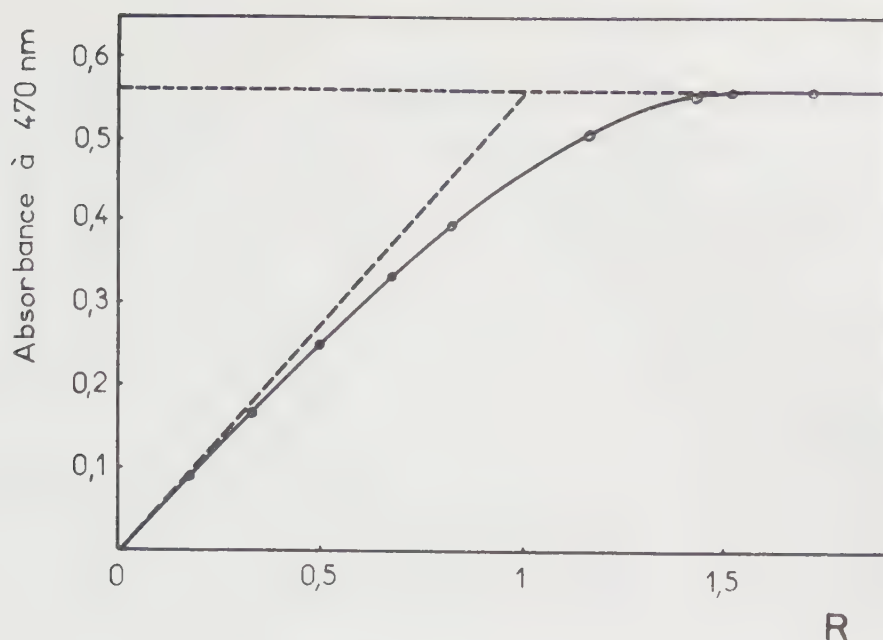


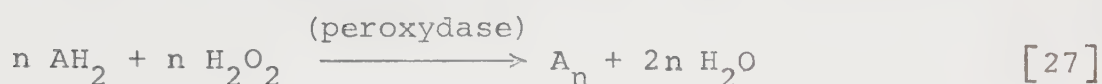
Figure 24

Courbe de titrage du gaïacol par l'eau oxygénée en présence de peroxydase.

La courbe est obtenue en portant la variation de l'absorbance à 470 nm en fonction du rapport R des concentrations initiales en eau oxygénée et en gaïacol ($R = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 / [\text{gaïacol}]_0$).

L'addition d'incréments d'eau oxygénée dans le milieu réactionnel (4,8 ml de tampon phosphate de sodium 0,025 M, pH 7, contenant 0,45 μmole de gaïacol et $0,75 \cdot 10^{-10}$ mole de peroxydase P_2) permet de faire varier R.

Il est important de remarquer que les courbes théoriques qui coïncident avec la courbe expérimentale de titrage correspondent à trois valeurs différentes de la constante d'équilibre K et à trois valeurs différentes du degré de polymérisation n du produit d'oxydation du gaïacol. Cependant elles correspondent toutes trois à la même valeur de N , 2, nombre d'électrons cédés par mole de gaïacol. Cette valeur de N nous permet de connaître le rapport des coefficients de stoechiométrie des réactifs qui est nécessairement égal à un si l'on tient compte du fait que l'eau oxygénée peut accepter deux électrons par molécule. La réaction globale peut donc s'écrire :



La valeur de n pourra être obtenue ultérieurement (page 105) par la détermination de la masse moléculaire du produit $\mathcal{P}$ d'oxydation du gaïacol car $\mathcal{P} = \text{A}_n$.

3) Spectrophométrie dans le visible et dans l'ultra-violet.

A . Spectres absolus

L'oxydation du gaïacol par l'eau oxygénée nécessite la présence d'un catalyseur. En présence de peroxydase, le pH optimum de cette réaction se situe au voisinage de la neutralité. Si l'on introduit de la peroxydase dans une solution de gaïacol et d'eau oxygénée tamponnée à pH 7, on observe la formation rapide d'une coloration brun rouge. La courbe 1 de la figure 25 A, page 91, représente le spectre du produit d'oxydation du gaïacol dans son milieu réactionnel à l'équilibre. Ce spectre présente deux pics d'absorption caractéristiques dans le visible à 420 et 470 nm, et une absorption très prononcée dans l'ultra-violet avec des épaulements entre 200 et 300 nm.

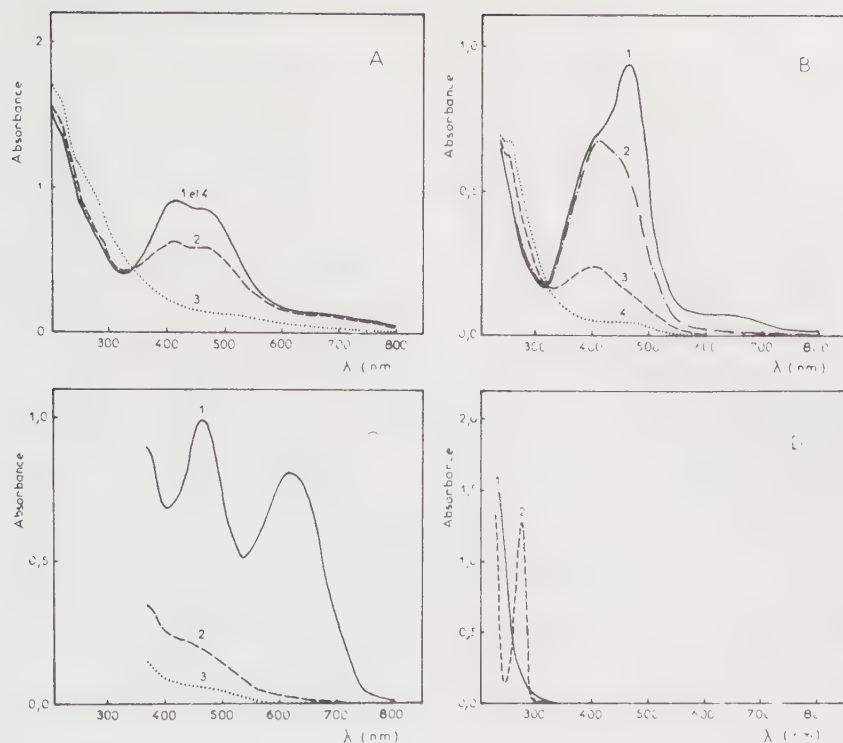


Figure 25

Spectres du produit d'oxydation du gaïacol dans différents solvants. Spectres du gaïacol et de l'eau oxygénée en solution aqueuse.

A. Evolution à la lumière du produit d'oxydation du gaïacol en milieu aqueux.

Le produit d'oxydation du gaïacol est obtenu en solution aqueuse en introduisant $2,8 \cdot 10^{-9}$ mole de peroxydase dans 32 ml de tampon phosphate de sodium 0,05 M, pH 7, contenant 30 μ mole de gaïacol et 60 μ mole d'eau oxygénée. Une partie aliquote de la solution est diluée cinq fois pour pouvoir faire les spectres.

1. Spectre du produit obtenu à l'obscurité.
2. Après exposition pendant 15 mn à la lumière.
3. Après exposition pendant 15 h. à la lumière.
4. Après addition d'eau oxygénée.

B. Evolution à la lumière du produit d'oxydation du gaïacol

Figure 25 (suite)

dans le chloroforme.

Le produit d'oxydation du gaïacol est extrait de la solution aqueuse avec 20 ml de chloroforme. L'extrait est dilué 9 fois avec du chloroforme pour pouvoir faire les spectres.

1. Extrait obtenu à l'obscurité.
2. Après exposition pendant 6 mn à la lumière.
3. Après exposition pendant 10 mn à la lumière.
4. Après exposition pendant 10 h. à la lumière.

C. Evolution à la lumière du produit d'oxydation du gaïacol dans le sulfure de carbone.

Le produit d'oxydation du gaïacol est extrait avec 5 ml de sulfure de carbone de la solution aqueuse obtenue par la méthode indiquée dans le schéma A.

1. Extrait obtenu à l'obscurité.
2. Après exposition pendant 1 h. à la lumière.
3. Après exposition pendant 12 h. à la lumière.

D. Spectres du gaïacol et de l'eau oxygénée.

1. Spectre de l'eau oxygénée $2,91 \cdot 10^{-2}$ M.
2. Spectre du Gaïacol en solution $5,71 \cdot 10^{-4}$ M dans l'eau.

Dans les conditions expérimentales décrites dans la figure 25 A (page 91) on n'observe pas de changement notable du spectre pendant plusieurs jours, si le milieu réactionnel est maintenu à l'obscurité. Par contre, l'exposition à la lumière entraîne la décoloration presque complète du milieu : les courbes 2 et 3 de la figure 25 A (page 91) montrent l'évolution du spectre au bout de 15 mn et 15 heures d'exposition à la lumière. Si on rajoute alors de l'eau oxygénée dans le milieu réactionnel le spectre du nouveau produit formé se superpose à la courbe 1 (figure 25 A, page 91) : cette dernière observation conduit à penser que l'eau oxygénée permet de réobtenir, par oxydation, le premier produit formé, et que l'action de la lumière est par conséquent une photoréduction.

L'évolution du produit d'oxydation $\mathcal{I}$ à la lumière dans des solvants non aqueux a également été effectuée lors de l'étude de ce produit, en spectrophotométrie infrarouge; cette étude nécessite en effet l'extraction, à l'obscurité, du produit par un solvant non aqueux ($\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_4$ et S_2C). Nous avons donc parallèlement effectué une étude spectrophotométrique, dans le visible et le proche ultraviolet, de son évolution à la lumière dans ces solvants. La courbe 1 de la figure 25 B (page 91) représente le spectre du produit d'oxydation du gaïacol, extrait du milieu réactionnel à l'obscurité, par le chloroforme. Le spectre présente une certaine similitude dans le visible avec celui obtenu en milieu aqueux (courbe 1 de la figure 25 A, page 91), notamment un pic d'absorption intense à 465 nm (au lieu de 470 nm en milieu aqueux), un épaulement à 415 nm (au lieu d'un pic à 420 nm). Comme en milieu aqueux, on observe une décoloration à la lumière (courbes 2, 3, 4 de la figure 25 B, page 91).

Lorsque l'extraction est faite avec le sulfure de carbone, le spectre du produit présente quelques différences (figure 25 C, page 91) : aucun pic ou épaulement à 420 nm, un pic supplémentaire à 620 nm. Dans tous les cas cependant, aussi bien en milieu aqueux que dans un solvant organique, le produit d'oxydation absorbe intensément vers 470 nm, dans l'ultra-violet, et il se décolore à la lumière. De plus, après une action prolongée de la lumière, un léger épaulement vers 500 nm apparaît sur le spectre. Il semble donc que cette évolution à la lumière conduise à un même produit et qu'elle ne nécessite pas la présence de molécules d'eau.

La forte absorption dans l'ultra-violet du gaïacol et de l'eau oxygénée, en milieu aqueux (figure 25 D, page 91), gêne considérablement l'observation de l'évolution du milieu réactionnel dans cette région. Aussi avons nous travaillé en spectrophotométrie de différence.

B. Spectres de différence.

La cuve de référence contient, comme la cuve de mesure, le gaïacol et l'eau oxygénée en solution tamponnée. La réaction est déclenchée en injectant la solution de peroxydase dans la cuve de mesure après avoir introduit au préalable, pour compenser l'effet de dilution, un volume égal d'eau dans la cuve de référence. La figure 26 A (page 94) montre que le produit d'oxydation du gaïacol est stable à l'obscurité, seulement dans le cas où la concentration en gaïacol dans le milieu réactionnel est relativement faible et le rapport R des concentrations initiales en eau oxygénée et gaïacol très supérieur à $\frac{1}{200}$ ([gaïacol] = $8,57 \cdot 10^{-5}$ M ; R = 50). Dans le cas contraire (figure 26B, page 94) où la concentration en gaïacol est grande et le rapport R faible ([gaïacol] = $1,14 \cdot 10^{-2}$ M ; R = 1/200), le spectre de différence du

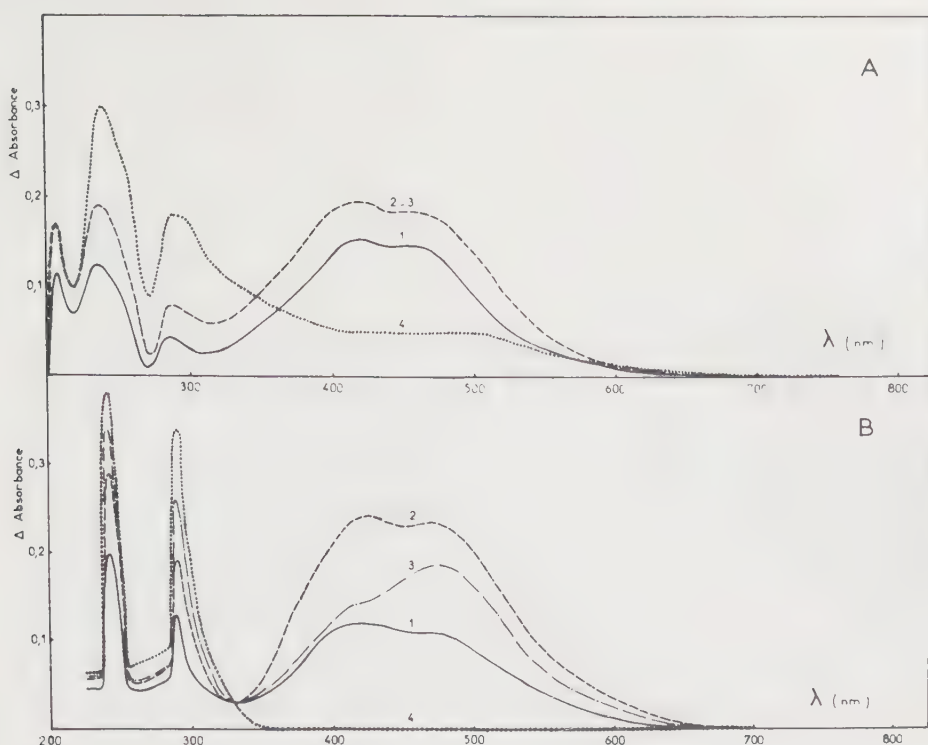


Figure 26

Spectres de différence.

A. Evolution du spectre du produit d'oxydation obtenu aux faibles concentrations en gaïacol.

La cellule de mesure renferme 3,5 ml de tampon phosphate de sodium 0,025 M, pH 7, contenant 15 μ moles d'eau oxygénée, 0,3 μ mole de gaïacol. La cellule de référence renferme 0,3 μ mole de gaïacol dissous dans 3,5 ml du même tampon.

La réaction est déclenchée par l'injection de $5 \cdot 10^{-3}$ μ mole de peroxydase.

1. Spectre obtenu à l'obscurité 10 mn après le début de la réaction.
2. Spectre obtenu à l'obscurité 20 mn après le début de la réaction.
3. Spectre obtenu à l'obscurité 48 h après le début de la réaction.
4. Spectre obtenu après quelques heures d'exposition à la lumière.

Figure 26 (suite)

B. Evolution du spectre du produit d'oxydation obtenu aux fortes concentrations en gaïacol.

La cellule de mesure renferme 3,5 ml de tampon phosphate de sodium 0,025 M, pH 7 contenant 0,2 μ mole d'eau oxygénée, 40 μ moles de gaïacol. La réaction est déclenchée par l'injection de $5 \cdot 10^{-3}$ μ mole de peroxydase. La cellule de référence renferme 40 μ moles de gaïacol dissous dans 3,5 ml du même tampon.

1. Spectre obtenu à l'obscurité 1 mn après le début de la réaction.
2. Spectre obtenu à l'obscurité 4 mn après le début de la réaction.
3. Spectre obtenu à l'obscurité 11 mn après le début de la réaction.
4. Spectre obtenu à l'obscurité 2 h. 30 mn après le début de la réaction.

produit d'oxydation évolue rapidement, même à l'obscurité. On observe en effet une décoloration totale du produit dans le visible et l'exaltation des deux pics situés dans l'ultra-violet (à 242 et 288 nm) avec formation d'un point isobestique à 330 nm. Si, une fois l'équilibre atteint, le milieu réactionnel est exposé à la lumière, aucune modification notable du spectre de différence n'est observable.

Pour la commodité de l'exposé, le produit obtenu aux fortes concentrations en gaïacol avec un rapport R inférieur à $\frac{1}{200}$ sera appelé P_G .

La figure 26 A (page 94) permet de suivre la formation de $\mathcal{P}$ à l'obscurité et sa transformation à la lumière en P_L . Elle montre de façon très nette que le spectre de différence de P_L (courbe 4 de la figure 26 A, page 94) est différent de celui de P_G (courbe 4 de la figure 26 B, page 94). En effet le spectre de différence de P_L fait apparaître :

- 1) une légère absorption dans le visible;
- 2) deux pics dans l'ultra-violet à 236 et 287 nm qui sont légèrement décallés par rapport à ceux observés dans le spectre de différence de P_G (242 et 288 nm);
- 3) une amplitude relative de ces deux pics différente de celle observée dans le spectre de différence de P_G . Le pic observé à 208 nm dans le spectre de différence de P_L n'a pu être observé dans celui de P_G en raison de la forte absorption du milieu réactionnel. Cette forte absorption, qui empêche d'effectuer des mesures d'absorbance dans cette région du spectre, est due à la concentration élevée du gaïacol nécessaire

pour former P_G . Ces quelques observations permettent de conclure que les produits P_L et P_G sont différents.

La figure 26 B (page 94) montre d'autre part que la formation de P_G passe par un intermédiaire (courbes 1 et 2) dont le spectre dans le visible est identique à celui de $\mathcal{J}$ (courbes 2 et 3 de la figure 26A, page 94), ce qui permet de penser que $\mathcal{J}$ est le précurseur de P_G . Les légères différences que l'on peut observer dans l'ultra-violet peuvent s'expliquer si l'on admet que la courbe 1 de la figure 26 B (page 94) représente le spectre de différence d'un mélange de P_G et de son précurseur $\mathcal{J}$, tandis que les courbes 1 et 2 de la figure 26 A (page 94) représentent le spectre de différence du seul produit $\mathcal{J}$ en cours de formation. Les expériences décrites ci-dessous ont permis de vérifier cette hypothèse.

C . Cinétiques de formation et de décomposition du produit d'oxydation du gaïacol à l'obscurité.

La variation d'absorbance du milieu réactionnel, enregistrée à 470 nm en fonction du temps, permet de suivre la cinétique de formation ou de décomposition de $\mathcal{J}$.

- Dans les conditions expérimentales de la figure 27 A (page 97) (concentration du gaïacol faible et R supérieur à $\frac{1}{200}$), seul le produit $\mathcal{J}$ se forme. On peut vérifier qu'une fois l'équilibre atteint, ce produit est stable à l'obscurité.*

* Le milieu réactionnel situé à l'intérieur du spectrophotomètre pendant la mesure est, en fait, soumis au rayonnement lumineux de la source qui a pour effet de faire diminuer légèrement l'absorbance en fonction du temps (d'environ 20% en deux heures). Cependant, devant le temps relativement court de l'expérience (17 mn) cet effet est négligeable et l'absorbance est constante.

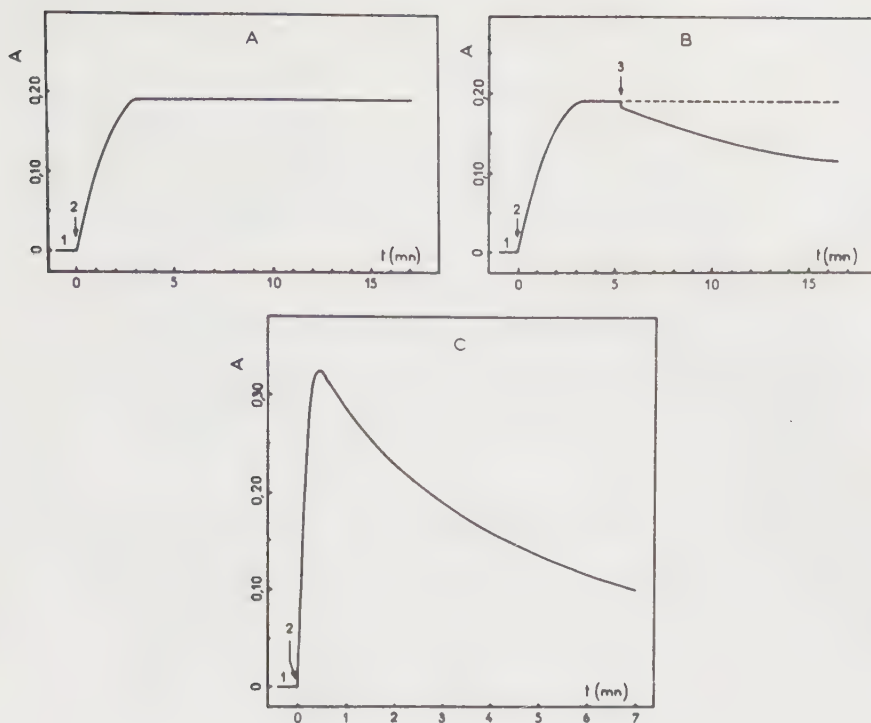


Figure 27

Cinétique de formation et de décomposition à l'obscurité du produit d'oxydation du gaïacol.

A. Formation du produit d'oxydation du gaïacol à l'obscurité.

1. Milieu réactionnel renfermant 0,225 μ mole de gaïacol et 0,225 μ mole d'eau oxygénée.
2. Introduction de $9 \cdot 10^{-5}$ μ mole de peroxydase. Le volume final est de 5,55 ml.

B. Formation du produit d'oxydation du gaïacol à l'obscurité et décomposition de ce produit par l'introduction de gaïacol en excès dans le milieu réactionnel.

1. Conditions identiques à celles de la figure A.
2. Introduction de $9 \cdot 10^{-5}$ μ mole de peroxydase. Le

Figure 27 (suite)

volume final est de 5,55 ml.

3. Introduction de 20 μ moles de gaïacol. Le volume final est alors de 5,75 ml.

C. Formation et décomposition du produit d'oxydation du gaïacol en présence d'un excès de gaïacol.

1. Milieu réactionnel renfermant 60 μ moles de gaïacol et 0,3 μ mole d'eau oxygénée.
2. Introduction de $9 \cdot 10^{-5}$ μ mole de peroxydase. Le volume final est de 5,25 ml.

Le pH de chaque milieu est de 7 (tampon phosphate de sodium 0,05 M).

- Si une solution concentrée de gaïacol est alors introduite dans le milieu réactionnel à l'équilibre, on observe aussitôt une diminution relativement rapide de l'absorbance (schéma B de la figure 27, page 97). Cette expérience montre que le produit P_G est bien obtenu par action du gaïacol sur $\mathcal{J}$. Cette conclusion est également confirmée par le fait que la valeur de la constante d'équilibre de la réaction globale fournie par les courbes de titrage* est relativement grande. Dans les conditions expérimentales décrites dans la figure 27 (page 97), on peut considérer, lorsque l'équilibre est atteint, en raison de l'importance de cette constante d'équilibre, que la presque totalité des réactifs (l'eau oxygénée en particulier) a été consommée. Si l'injection d'une solution concentrée de gaïacol déclenche une réaction, ce dernier ne peut réagir qu'avec $\mathcal{J}$ qui est donc bien le précurseur de P_G .
- Lorsque la concentration initiale du gaïacol est forte et R très faible ($R = 1/200$), le produit $\mathcal{J}$, sous l'action du gaïacol en excès, se transforme en P_G dès qu'il est formé. La figure 27 C (page 97) montre que la vitesse de formation de $\mathcal{J}$

* D'après l'équation (27) (page 90), la valeur de la constante d'équilibre pourra être déterminée à l'aide de la courbe de titrage du gaïacol et de la masse moléculaire de $\mathcal{J}$ qui nous sera fournie par son spectre de masse.

est plus rapide que celle de sa transformation en P_G au début de la réaction.

L'ensemble de ces résultats est schématisé dans la figure 28 (page 100).

Le problème de savoir si les étapes de formation de P_L et de P_G sont enzymatiques, sera résolu dans le paragraphe consacré à la localisation des étapes enzymatiques de la réaction (page 115).

4) Spectrophotométrie dans l'infra-rouge.

Nous avons analysé les spectres du gaïacol et de ses produits d'oxydation obtenus à la lumière et à l'obscurité. En raison de leur trop forte absorbance dans certaines régions du spectre infra-rouge, plusieurs solvants organiques ont été utilisés pour extraire le produit d'oxydation de son milieu réactionnel aqueux :

CCl_4	entre	400	et	1400 cm^{-1}
CS_2	entre	1300	et	4000 cm^{-1}
$CHCl_3$	entre	1000	et	2000 cm^{-1}
	et	entre	2850	et 3800 cm^{-1}

A. Spectre I.R. du gaïacol.

La figure 29 A (page 101) représente le spectre IR du gaïacol dissous dans le chloroforme, dans les régions du spectre où l'absorption de ce solvant n'est pas trop intense. On peut observer un pic d'absorption à 3440 cm^{-1} dû à la vibration de valence de la liaison (OH); les vibrations de valence des groupements méthoxy ($O-CH_3$) apparaissent entre 1330 et 1485 cm^{-1} .

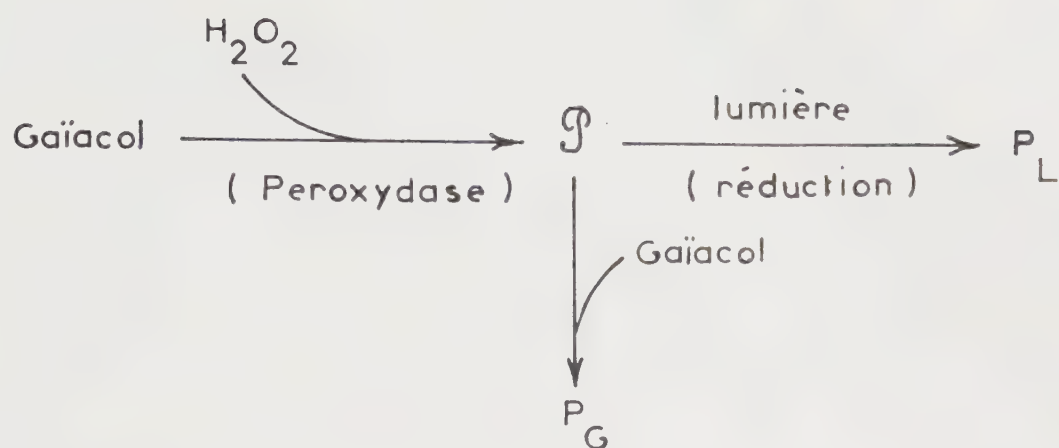


Figure 28

Schéma réactionnel de l'oxydation du gaïacol par l'eau oxygénée en présence de peroxydase.

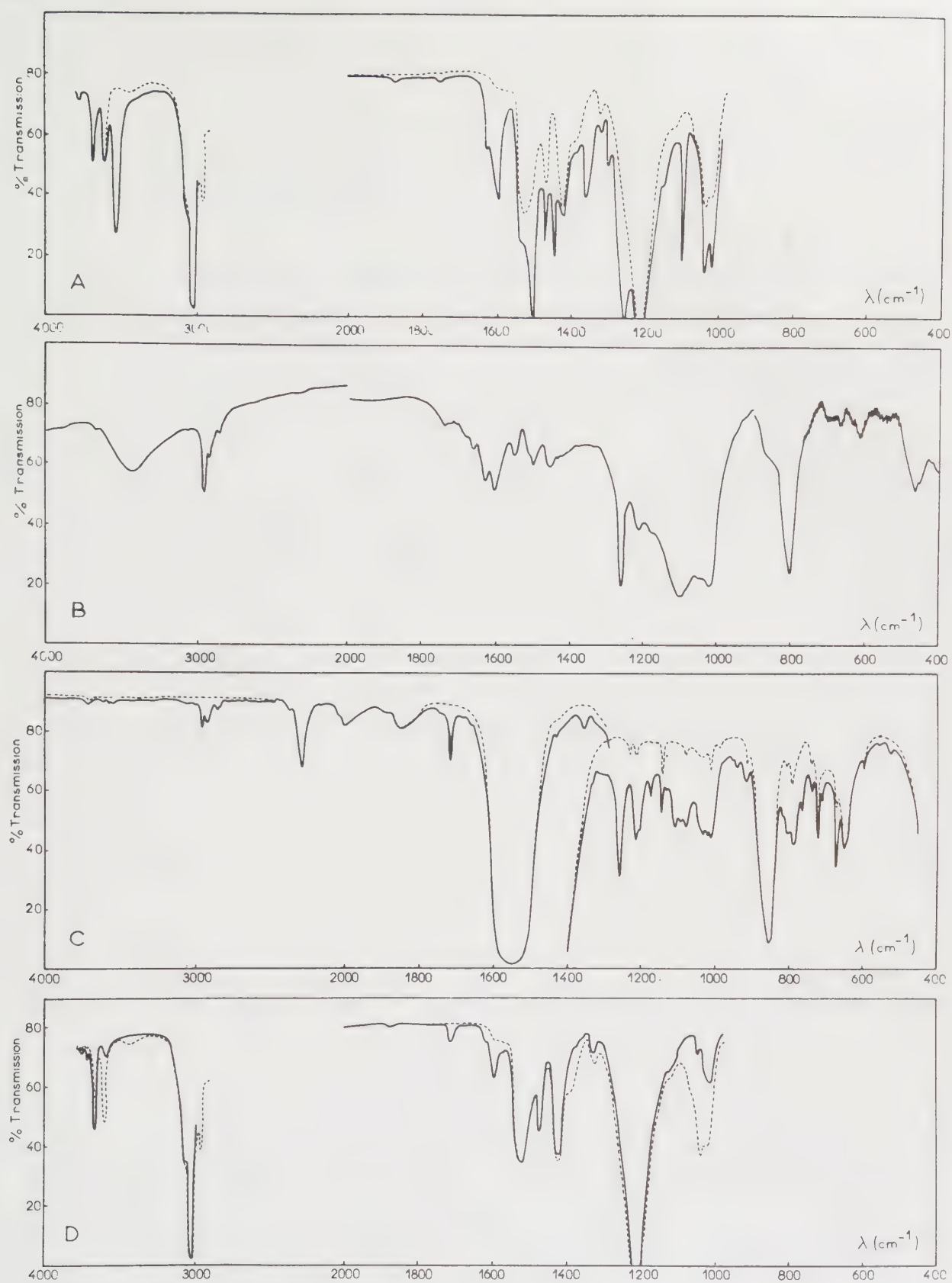


Figure 29

Spectres dans l'infra-rouge.

A. Spectre du gaïacol en solution dans le chloroforme ($2 \cdot 10^{-2} \text{M}$)

Figure 29 (suite)

(la courbe tracée en pointillé représente le spectre du chloroforme).

- B. Spectre en pastille de KBr du produit d'oxydation du gaïacol préparé à la lumière.
- C. Spectre du produit d'oxydation du gaïacol, préparé à l'obscurité, et dissous dans un solvant (la courbe tracée en pointillé représente le spectre du solvant : S_2C entre 4000 cm^{-1} et 1300 cm^{-1} et CCl_4 entre 1400 cm^{-1} et 400 cm^{-1}).
- D. Spectre du produit d'oxydation du gaïacol préparé à l'obscurité, et dissous dans le chloroforme (la courbe tracée en pointillé représente le spectre du chloroforme).

La présence d'une insaturation de la molécule aromatique peut être décelée par la présence d'un pic à 1595 cm^{-1} , de deux harmoniques à 1745 et 1865 cm^{-1} (pics dont l'intensité est très faible) et de plusieurs pics entre 1000 et 1300 cm^{-1} dus à des vibrations du squelette de la molécule cyclique.

B . Spectre I R du produit d'oxydation du
gaïacol $\mathcal{J}$ préparé à l'obscurité.

La figure 29 C (page 101) représente le spectre du produit d'oxydation $\mathcal{J}$ dans le solvant ayant servi à l'extraire du milieu réactionnel aqueux. Afin d'éviter son évolution à la lumière, la préparation de l'extrait, son évaporation partielle, le remplissage de la cellule de mesure, et l'introduction de cette dernière dans le spectrophotomètre sont effectués à l'obscurité. Entre 400 et 1400 cm^{-1} (solvant C Cl_4), les différents pics observés peuvent être attribués aux vibrations du squelette d'une molécule cyclique et permettent de supposer la présence d'aromatiques. Entre 1300 et 4000 cm^{-1} (solvant C S_2), les groupements $(\text{O}-\text{C H}_2)$ ou $(\text{O}-\text{C H}_3)$ peuvent être décelés par la présence d'un pic d'absorption à 1355 cm^{-1} et de deux pics à 2920 et 2960 cm^{-1} . Il est très important de remarquer l'existence d'un pic relativement intense à 1715 cm^{-1} , dû à la vibration de valence $\nu (\text{C}=\text{O})$, qui permet de supposer la présence d'une quinone. L'absence de pic dans la région des 3500 cm^{-1} (vibration de la liaison OH) permet de conclure qu'il n'existe pas de fonction phénol dans le milieu. La vibration de la liaison $\nu (\text{C}=\text{O})$ est également observable dans le chloroforme à 1725 cm^{-1} (figure 29 D , page 101).

Si la cellule de mesure est ensuite exposée à la lumière, on observe alors une diminution de l'intensité du pic situé à 1715 cm^{-1} ; par contre on n'observe pas l'apparition de pic dans la région des 3500 cm^{-1} qui pourrait être dû à la réduction de la quinone en phénol.

C . Spectre I R du produit d'oxydation P_L du
gaïacol préparé à la lumière.

Le spectre en pastille de KBr du produit P_L d'oxydation du gaïacol obtenu à la lumière est représenté dans la figure 29 B (page 101). Il est important de remarquer qu'aucun pic d'absorption dû à la vibration de valence $\nu(\text{C}=\text{O})$ n'apparaît dans la région des 1700 cm^{-1} . Par contre, on peut observer un pic à $3420 - 3430\text{ cm}^{-1}$ que l'on peut attribuer à la vibration de la liaison (OH).

La présence de groupement $(\text{O}-\text{CH}_2)$ ou $(\text{O}-\text{CH}_3)$ peut être détectée par l'existence de pics à 2960 et 2925 cm^{-1} . Deux pics à 1600 et 1630 cm^{-1} font apparaître une insaturation de la molécule qui est probablement aromatique.

5) Spectrométrie de R M N

Le spectre de résonance magnétique nucléaire du produit d'oxydation du gaïacol P_L préparé à la lumière est représenté dans la figure 30, page 104 . Etant donné la très faible solubilité du produit dans le chloroforme deutérié, l'amplitude des pics est très faible. On peut cependant déceler la présence d'aromatiques et de groupements $(\text{O}-\text{CH}_2)$ ou $(\text{O}-\text{CH}_3)$. En raison de difficultés techniques, nous n'avons pu effectuer le spectre de R M N du produit d'oxydation du gaïacol $\mathcal{I}$ préparé à l'obscurité.

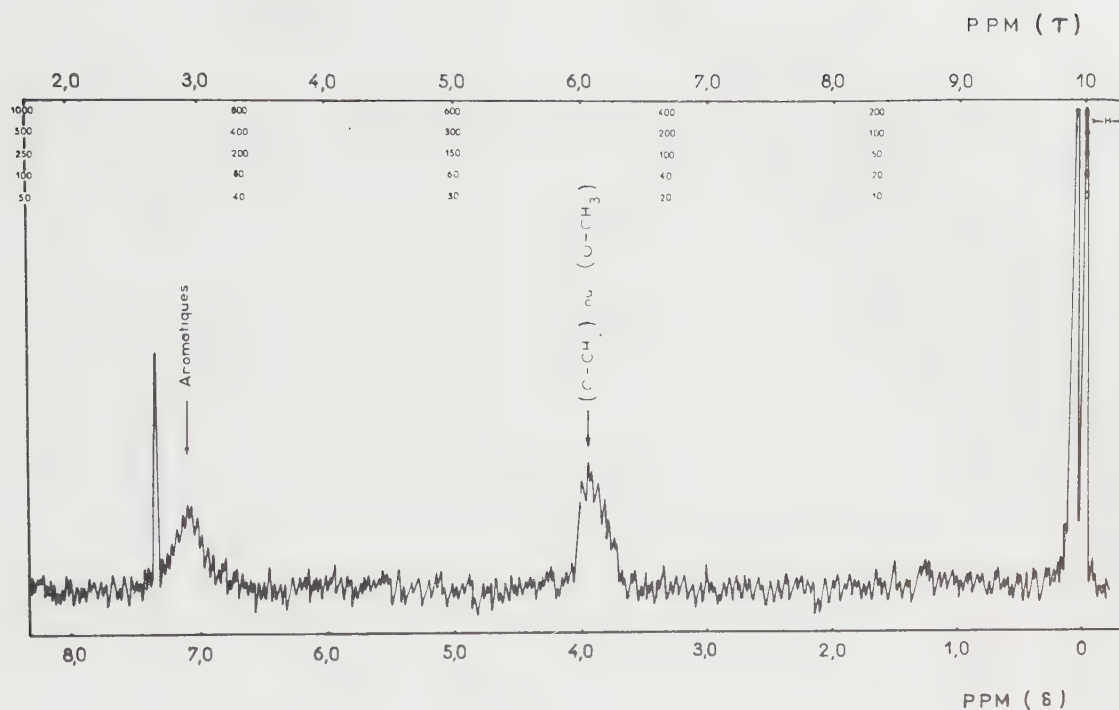


Figure 30

Spectre de Résonance Magnétique Nucléaire du produit d'oxydation du gaïacol préparé à la lumière.

6) Spectrométrie de masse.

Les spectres de masse sont effectués sur le produit d'oxydation du gaïacol P_L préparé à la lumière (figure 31 A, page 106) et sur le produit d'oxydation $\mathcal{I}$ préparé à l'obscurité * (figure 31 B, page 106). Les masses de P_L et de $\mathcal{I}$ sont respectivement 246 et 458. Il est important de remarquer que le spectre de masse de $\mathcal{I}$ (figure 31B, page 106) présente un pic à 351 mais pas de pic entre 458 et 351 (en particulier, aucun pic correspondant à la perte d'un groupement méthoxy ou méthyl).

II. Mécanisme possible de l'oxydation.

Il est important de retenir, de l'étude qui précède, les principaux points suivants qui nous permettrons de proposer un mécanisme susceptible d'expliquer la formation de $\mathcal{I}$.

- Pour chaque molécule de gaïacol que l'on veut oxyder, il est nécessaire d'utiliser une molécule d'eau oxygénée (courbe de titrage). Ceci implique que les deux équivalents oxydants de l'eau oxygénée soient transférés sur une seule et même molécule de gaïacol et montre que l'hypothèse, classiquement admise, selon

* Pour la spectrométrie de masse, $\mathcal{I}$ est préparé à l'état solide. Pour cela, la méthode indiquée page 86 est utilisée, mais l'extrait est évaporé jusqu'à siccité.

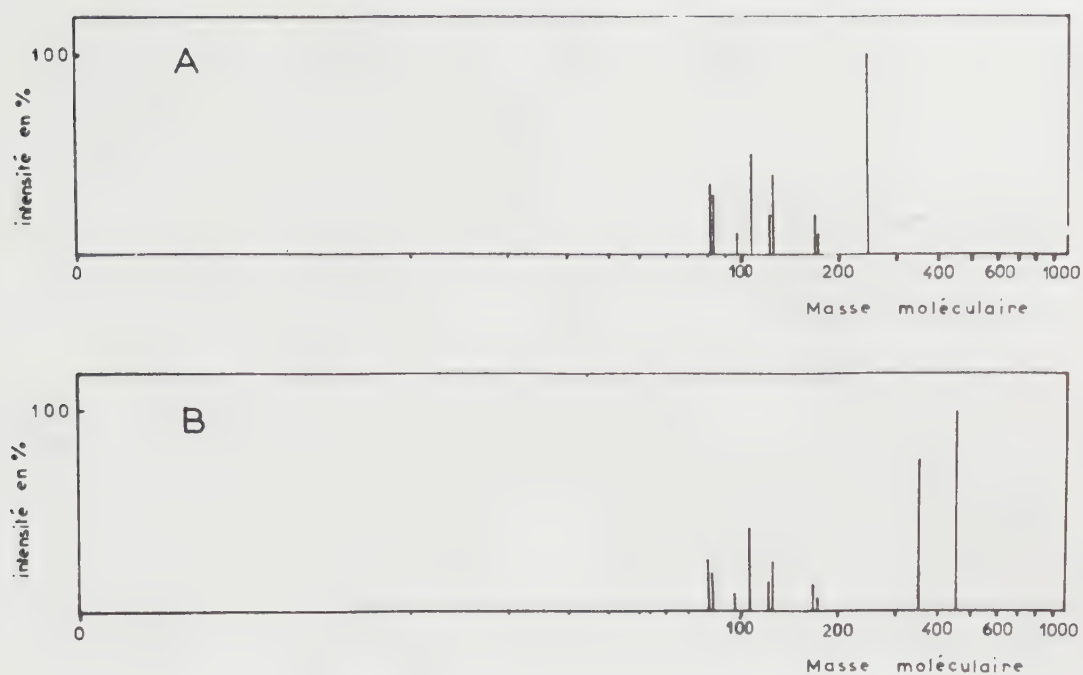


Figure 31

Spectres de masse du produit d'oxydation du gaïacol.

A. Produit préparé à la lumière.

B. Produit préparé à l'obscurité.

laquelle le système "peroxydase - peroxyde" oxyde deux molécules de donneur, n'est pas toujours vérifiée.

- Le produit $\mathcal{P}$ obtenu, très coloré, (spectre visible) est une molécule fortement conjuguée contenant la fonction quinone (spectre I R et visible) et des groupements O-CH_2 ou O-CH_3 (spectre I R et de R M N). Le squelette de la molécule est vraisemblablement aromatique (spectres I R et R M N). Ainsi, le produit d'oxydation du gaïacol a une structure quino- nique et non la structure phénolique proposée par BOOTH et SAUNDERS (figure 8 B, page 21).
- La masse de ce produit est de 458. Cette valeur est en complet désaccord avec celle, 246, correspondant à la formulation donnée par BOOTH et SAUNDERS (figure 8 B, page 21). Ceci constitue un argument supplémentaire pour mettre en doute leur formulation. Le spectre de masse présente un pic à 351 mais pas de pic à 246. Entre les pics à 458 et 351, on n'observe aucun pic (qui pourrait correspondre à la perte d'un O-CH_3 ou CH_3).
- La lumière provoque une photoréduction de ce produit et conduit à un produit de masse 246 (spectre visible et spectre de masse).

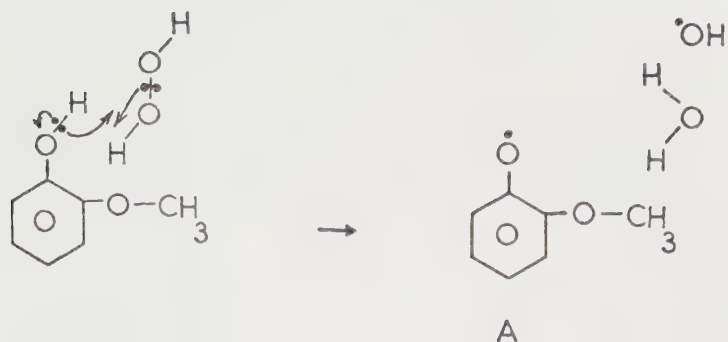
Le modèle réactionnel que nous allons maintenant développer tient compte des remarques précédentes et aussi du rôle de l'enzyme qui fixe l'eau oxygénée, en captant les deux équivalents oxydants, et les transfère ensuite

sur un donneur d'électrons (ici le gaïacol). La réaction fondamentale correspondrait à la formation d'un bi-radical à partir duquel il est possible de rendre compte de la formation du produit $\mathcal{S}$ et également du produit obtenu antérieurement par BOOTH et SAUNDERS (57).

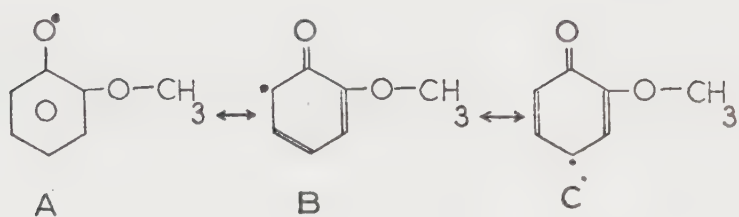
1) Formation d'un bi-radical

La valeur relativement importante de la masse moléculaire (458) du produit d'oxydation du gaïacol (masse moléculaire : 124) permet de penser qu'il est obtenu par association ou polymérisation de plusieurs noyaux aromatiques. Il est cependant peu vraisemblable, à priori, que toutes les étapes du mécanisme permettant d'aboutir à la formation de ce produit, et en particulier la dernière, la polymérisation, soient enzymatiques. En effet cela supposerait que l'enzyme peut fixer, en plus de la molécule d'eau oxygénée, plusieurs molécules de gaïacol, ce qui est en contradiction formelle avec les résultats fournis par l'étude cinétique à l'état stationnaire dont nous parlerons plus loin. L'hypothèse la plus vraisemblable consiste donc à admettre la formation enzymatique d'un monomère oxydé qui se transformerait ensuite, par une série d'étapes non enzymatiques, en un polymère de masse moléculaire 458. Les courbes de titrage ayant montré que le gaïacol était susceptible de céder deux électrons, il faut donc admettre que la première réaction correspond à la formation d'un bi-radical dont la molécule serait constituée par un seul noyau aromatique. Dans ces conditions, il y aurait d'abord * formation d'un mono-radical suivant le schéma:

* On pourrait tout aussi bien envisager la formation directe du bi radical sans passage intermédiaire par le mono radical A. Dans ce cas le transfert des deux électrons s'effectuerait de façon concertée.



Ce mono-radical peut exister sous plusieurs formes mésomères :



Le radical OH• peut réagir à nouveau sur A, B, C pour conduire au bi-radical D dérivé de A :



2) Transformation et réactions secondaires du
bi-radical conduisant au produit G.

Le bi-radical D peut évoluer, par une réaction intramoléculaire, pour donner le 1,3 dioxalane soit



E

dioxalane 1,3

puis, par hydrolyse, en diphénol :

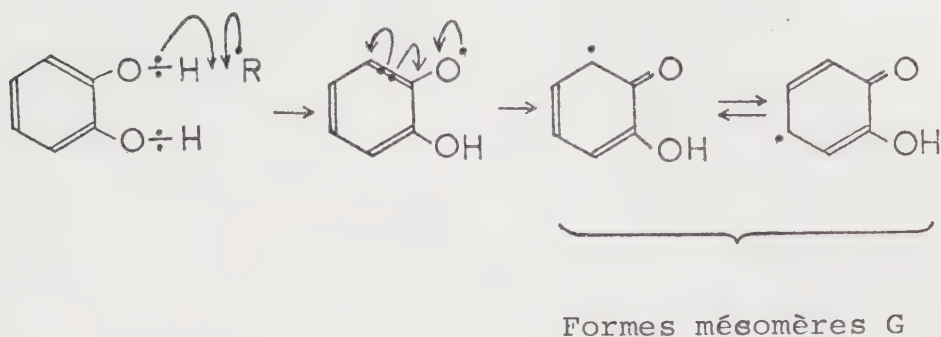


F

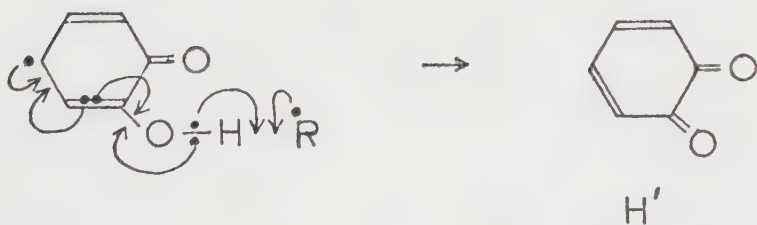
diphénol

* On ne peut pas doser de >C=O car il y a trop de produits
différents contenant du >C=O dans le milieu réactionnel.

Le diphénol peut évoluer ensuite vers l'orthobenzoquinone H' par oxydation radicalaire suivant la séquence.

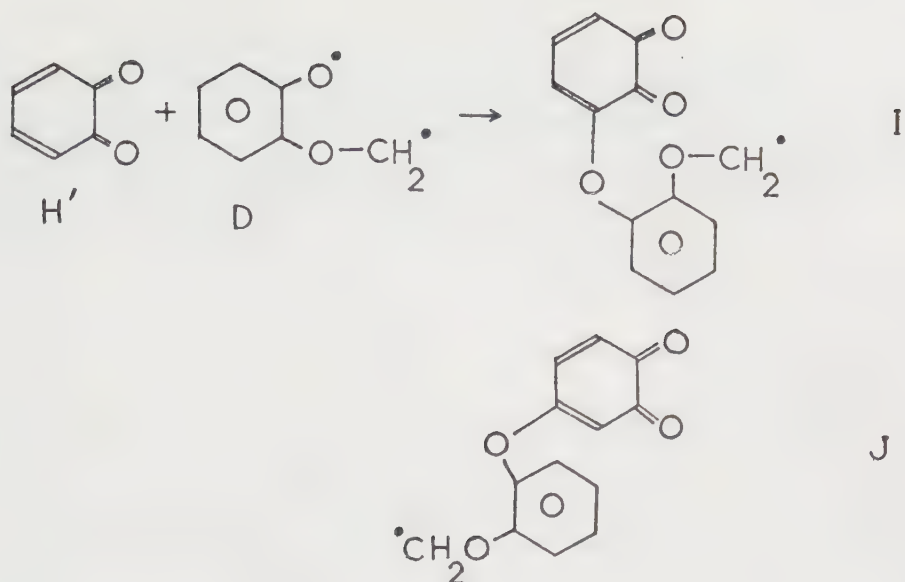


A partir de ces deux formes mésomères G, on pourrait assister à une réaction de ces formes entre elles (réactions de couplage OO', PP', OP') mais de tels produits n'ont pas été observés en spectrométrie de masse. L'évolution la plus probable est donc une deuxième oxydation radicalaire de la forme phénolique soit :

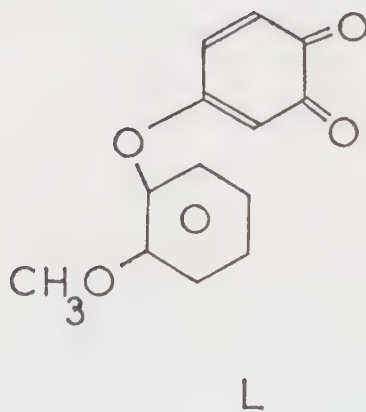
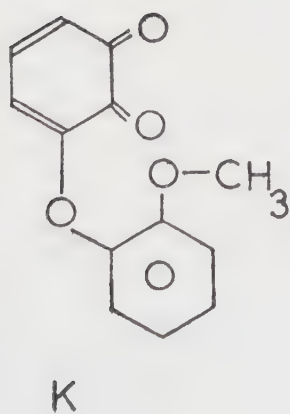


Les radicaux pouvant réaliser cette oxydation sont nombreux : $\cdot\text{OH}$ / A, B, C / D $\rightarrow$ A, B, C / G $\rightarrow$ F /

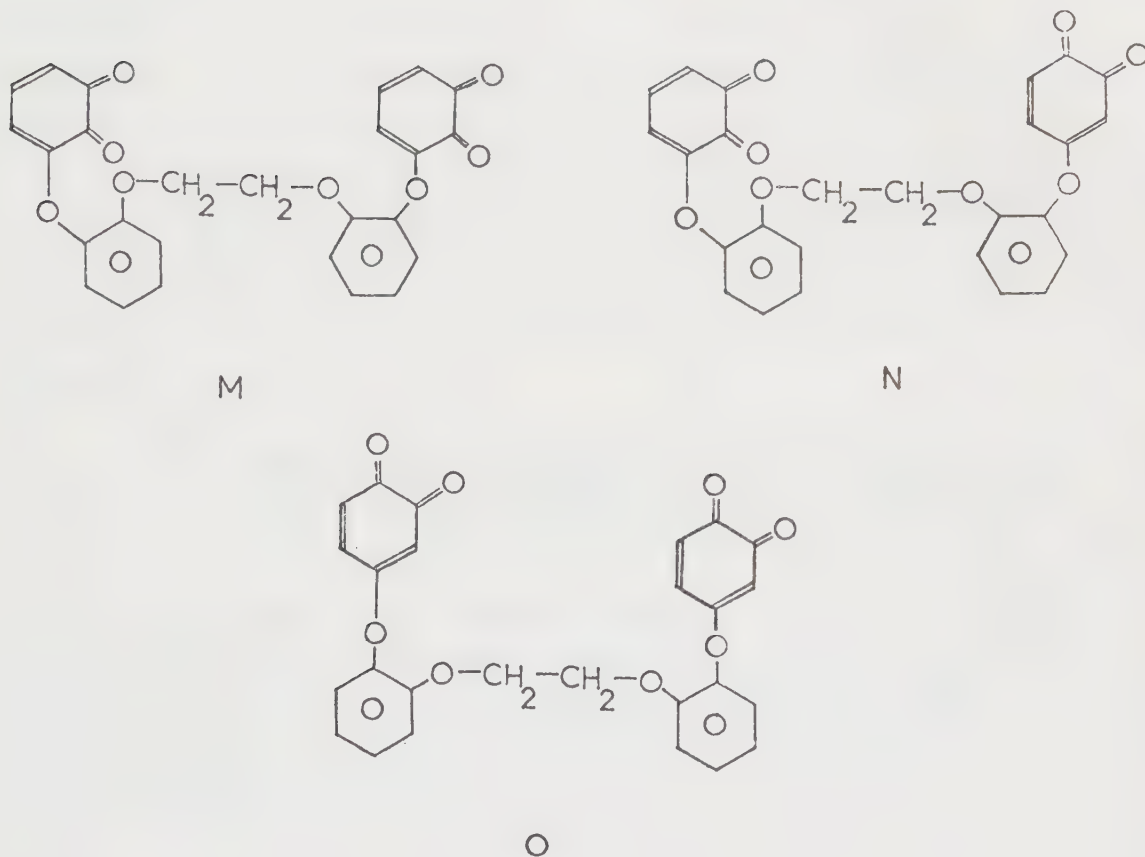
Le produit H' ainsi formé est un réactif potentiel énergétique. Il pourra donc fixer le bi-radical D pour conduire à un mono-radical I ou J soit



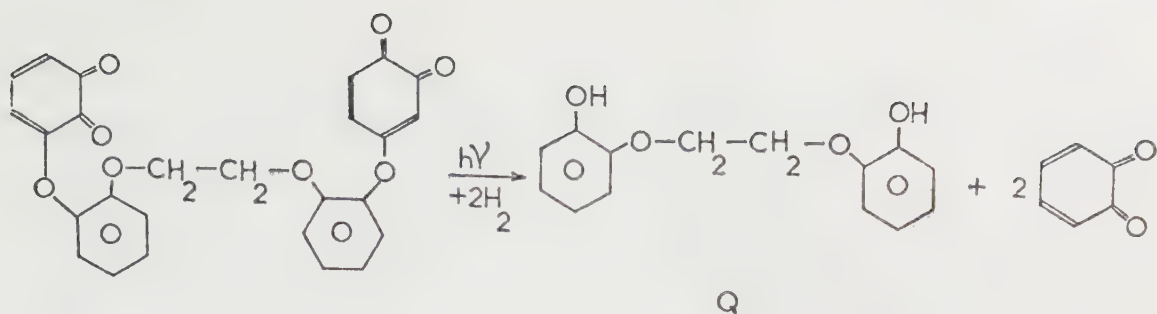
Les mono-radicaux I, J pourraient donc, soit réaliser une abstraction d'hydrogène du solvant pour conduire à des produits K, L non détectés,



soit, par une réaction de couplage, conduire à des dimères M, N, O qui correspondraient aux différentes formulations possibles du produit *9* défini précédemment (page 86), à savoir :



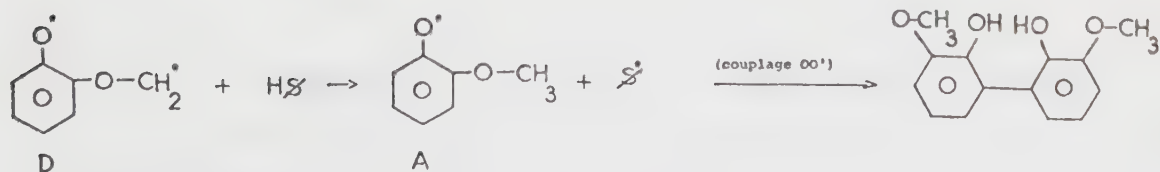
Les produits M, N, O ont été détectés en spectrométrie de masse (masse 458) et peuvent, par photoréduction, conduire à des produits Q dont la masse moléculaire détectée est de 246 soit



Cette réaction de photoréduction permet donc d'obtenir des produits dont la masse moléculaire (246) est identique à celle du 2:2'dihydroxy-3:3'diméthoxydiphényl (figure 8 B, page 21) proposé par BOOTH et SAUNDERS (57).

3) Obtention des produits mis en évidence par BOOTH et SAUNDERS (figure 8 B, page 21)

On peut les obtenir à partir de B et C, ce qui constituerait une réaction secondaire ; mais on peut aussi les obtenir à partir de D. En effet, en milieu protique, D peut arracher un hydrogène du solvant (pour conduire à A) soit



Il est probable que d'autres produits obtenus par couplage OP' , PP' soient aussi présents dans le milieu réactionnel. Cependant l'impossibilité de pondérer exactement les structures mésomères A, B, C ne nous permet pas d'isoler de tels produits. Il nous reste maintenant à considérer avec plus de précision le site d'action de l'enzyme dans ce mécanisme.

III - Localisation des étapes enzymatiques de la réaction dans le modèle général.

Nous étudierons successivement les réactions de formation des produits $\mathcal{P}$, P_G et P_L .

1) Réaction de formation du produit $\mathcal{P}$

La vitesse initiale de formation de ce produit est déterminée par la mesure de la variation d'absorbance (à 470 nm) du milieu réactionnel en fonction du temps, en début de réaction; nous avons pu vérifier qu'elle est proportionnelle à la concentration en enzyme. Ce résultat prouve que la réaction d'oxydation du gaïacol par l'eau oxygénée est bien une réaction enzymatique. Il est confirmé par le fait que la réaction n'a pas lieu en l'absence de peroxydase. La proportionnalité de la vitesse en fonction de la concentration en enzyme permet de penser que le système "gaïacol , eau oxygénée, peroxydase" est à l'état stationnaire au moment où l'on mesure la vitesse.

2) Réaction de formation du produit P_G

Lorsque la concentration du gaïacol est relativement grande et le rapport des concentrations initiales en eau oxygénée et en gaïacol faible, on peut suivre à 470 nm

la formation de $\mathcal{S}$ et sa transformation en P_G sous l'action du gaïacol (le produit P_G étant incolore alors que $\mathcal{S}$ est fortement coloré, la transformation de $\mathcal{S}$ en P_G se traduit par une diminution d'absorbance). La courbe a de la figure 32 B (page 117) montre que l'absorbance croît tout d'abord en fonction du temps, passe par un maximum et ensuite décroît. De plus, la croissance avant le maximum est plus rapide que la décroissance observée ensuite. D'après l'allure de cette courbe, il est logique de penser que lorsque le maximum est atteint, la réaction de formation de $\mathcal{S}$ est pratiquement terminée, alors que la transformation de $\mathcal{S}$ en P_G est à peine amorcée. Si cette dernière réaction est enzymatique, l'introduction d'une nouvelle quantité de peroxydase dans le milieu réactionnel quand le maximum d'absorbance est atteint doit alors nécessairement accélérer la disparition de $\mathcal{S}$ donc accentuer la diminution en fonction du temps de l'absorbance à 470 nm. La courbe b de la figure 32 B (page 117) montre qu'il n'en est rien. La réaction $\mathcal{S} \longrightarrow P_G$ n'est donc pas une réaction enzymatique.

3) Réaction de formation du produit P_L

La courbe a de la figure 32 B (page 117) montre la formation relativement rapide de $\mathcal{S}$, suivie de sa transformation, beaucoup plus lente en P_L , provoquée par le seul rayonnement de la source du spectrophotomètre (rayonnement monochromatique de longueur d'onde 470 nm émis par l'appareil pendant la mesure de l'absorbance). Ce rayonnement étant de faible intensité, l'absorbance du milieu réactionnel diminue seulement de 20% en deux heures. Si on recommence l'expérience avec les mêmes réglages de spectrophotomètre (même ouverture de la fente

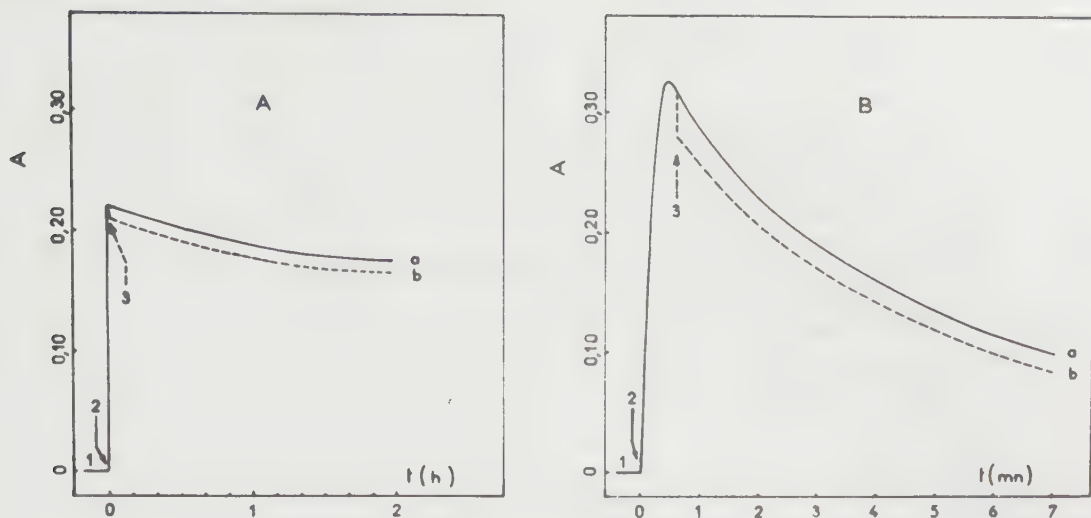


Figure 32

Influence de la peroxydase sur la vitesse de formation des produits P_L et P_G (définis respectivement pages 86 et 95).

A. Formation du produit d'oxydation du gaïacol suivie de sa décomposition en P_L par la lumière

1. Milieu réactionnel renfermant 0,45 μ mole de gaïacol et 22,5 μ moles d'eau oxygénée.
2. Introduction de $9 \cdot 10^{-5}$ μ mole de peroxydase. Le volume final est de 5,0 ml. La courbe a représente la cinétique de décomposition du produit d'oxydation à la lumière.
3. Introduction de 27,8 μ moles de peroxydase. Le volume final devient 5,20 ml. La courbe b représente la nouvelle cinétique obtenue dans ces conditions.

B. Formation du produit d'oxydation du gaïacol suivie de sa décomposition en P_G obtenue aux fortes concentrations en gaïacol.

1. Milieu réactionnel renfermant 60 μ moles de gaïacol et 0,3 μ mole d'eau oxygénée.
2. Introduction de 9.10^{-5} μ mole de peroxydase. Le volume final devient 5,0 ml. La courbe a représente la cinétique de décomposition du produit d'oxydation aux fortes concentrations en gaïacol.
3. Introduction de 27,8 μ moles de peroxydase. Le volume final devient 5,20 ml. La courbe b représente la nouvelle cinétique obtenue dans ces conditions.

Les mesures sont effectuées à pH 7,0 (tampon phosphate de sodium 0,2 M).

et même longueur d'onde), l'introduction d'une nouvelle quantité de peroxydase dans le milieu, au moment où le maximum d'absorbance est atteint, ne provoque pas une décroissance plus rapide de cette absorbance. La transformation de $\mathcal{S}$ en P_L par la lumière n'est donc pas catalysée par la peroxydase. Ce résultat est confirmé par l'étude spectrophotométrique, décrite précédemment (page 92), de l'action de la lumière sur $\mathcal{S}$ en solution dans différents solvants organiques (figures 25 B et C, page 91). Nous avons en effet montré que l'évolution à la lumière pouvait avoir lieu même en l'absence d'enzyme: au cours de l'extraction effectuée avec le solvant organique, seul le produit $\mathcal{S}$ passe en solution dans ce solvant; la peroxydase, étant insoluble dans les solvants organiques, reste dans la phase aqueuse constituée par le milieu réactionnel.

4) Conclusion

L'utilisation des données cinétiques précédentes et l'analyse des produits obtenus permettent de proposer un mécanisme réactionnel qui tient compte à la fois de la stoechiométrie de la réaction et des mesures physiques (RMN, IR, UV, Visible, Masse) réalisées sur nos mélanges réactionnels.

La complexité du phénomène étudié, et la pluralité des produits obtenus n'excluent pas la possibilité que d'autres mécanismes concomittants puissent se dérouler dans le milieu. Dans nos conditions expérimentales, cependant, de tels mécanismes ne pourraient être que très secondaires.

Il faut retenir de l'analyse précédente les quatre points importants suivants. Ils seront très utiles dans l'étude cinétique à l'état stationnaire qui

va suivre.

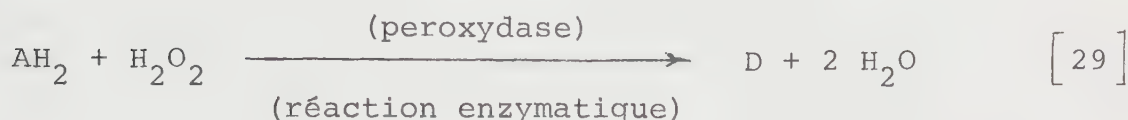
- Seule la réaction correspondant à la formation du bi-radical D est enzymatique.
- Dans cette réaction, chaque molécule de gaïacol oxydé en bi-radical D nécessite l'utilisation d'une molécule d'eau oxygénée.
- La réaction radicalaire (non enzymatique) de transformation de D en $\mathcal{P}$ s'effectue sans consommation supplémentaire d'eau oxygénée. Ceci est capital car la stoechiométrie de la réaction globale de formation de $\mathcal{P}$ à partir du gaïacol et de l'eau oxygénée doit correspondre à une valeur du rapport R ($R = [\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{gaïacol}]$) de 1.
- La formule de $\mathcal{P}$ (formule M ou N ou O, page 113) contient quatre noyaux aromatiques. Celle de D en contient un seul qui provient de la molécule de gaïacol. Les quatre noyaux aromatiques contenus dans $\mathcal{P}$ ne pouvant provenir que de D, tout se passe en définitive comme si la réaction globale [27] de la page 90 pouvait s'écrire :



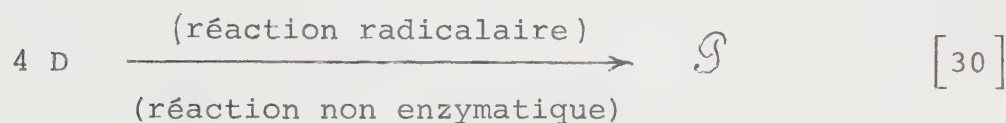
Seule cette écriture simplifiée de la réaction globale permet de comparer la courbe de titrage du gaïacol par l'eau oxygénée (figure 24, page 89) aux courbes théoriques de titrage (figure 15 D,E,F, page 58) et de déterminer ainsi la constante d'équilibre de cette réaction globale.

* AH_2 représente ici le gaïacol.

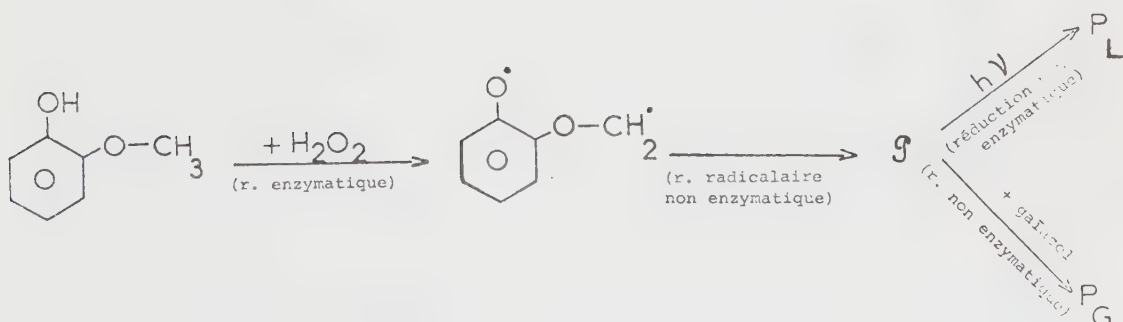
La réaction globale [28] peut se décomposer en deux réactions successives. La première est une réaction enzymatique qui conduit à la formation du bi-radical D :



La deuxième est une réaction radicalaire, non enzymatique, qui correspond à la transformation du bi-radical D en $\mathcal{J}$:



L'ensemble de ces résultats et les équations [29] et [30] permettent donc de détailler le modèle exposé antérieurement (figure 28, page 100) soit



Dans ce modèle, $\mathcal{P}$ (formule M ou N ou O, page 113) représente le produit d'oxydation du gaïacol obtenu à l'obscurité lorsque la concentration du gaïacol est inférieure à $2 \cdot 10^{-3}$ M et le rapport $R = [\text{H}_2\text{O}_2] / [\text{gaïacol}]$ très supérieur à $\frac{1}{200}$; P_L (formule Q, page 114) représente le produit obtenu par photoréduction de $\mathcal{P}$; P_G le produit obtenu par action du gaïacol sur $\mathcal{P}$ lorsque la concentration du gaïacol est supérieure à $2 \cdot 10^{-3}$ M et R inférieur ou égal à $\frac{1}{200}$. Nous ne sommes pas en mesure de proposer une formule pour P_G mais son existence a été démontrée par spectrophotométrie de différence (courbe 4 de la figure 26 B, page 94).

IV. Etude de l'étape enzymatique de la réaction.

Nous allons maintenant nous intéresser uniquement à la réaction enzymatique et essayer de déterminer un modèle réactionnel qui permettra de décrire la succession des événements qui se déroulent au niveau de l'enzyme. Cette réaction est une réaction à deux substrats (le gaïacol et l'eau oxygénée) et un produit (le bi-radical D). On peut considérer en effet que la quantité d'eau présente dans le milieu réactionnel est constante. Au cours de la catalyse, chacun de ces substrats va nécessairement se fixer sur l'enzyme. L'existence d'un complexe peroxydase - H_2O_2 (composé I) est bien connue. Par contre, celle d'un complexe peroxydase - gaïacol n'a jamais été démontrée. Nous commencerons donc par sa mise en évidence.

1) Mise en évidence de la formation d'un complexe entre le gaïacol et la peroxydase.

Si l'on introduit du gaïacol dans une solution de peroxydase, on observe de légères modifications spectrales, qui ne peuvent être mises en évidence de manière

reproductible qu'avec des solutions d'enzyme très concentrées et un spectrophotomètre sensible. Ces modifications spectrales sont représentées par le spectre de différence A de la figure 33 (page 123). En présence de gaïacol, l'hématine, qui correspond au groupement prosthétique de la peroxydase, présente elle aussi des modifications spectrales (spectre de différence B de la figure 33, page 123). Ces résultats impliquent que le gaïacol peut former avec la peroxydase ou l'hématine un complexe stable dont les caractéristiques spectrales sont définies par les schémas A et B de la figure 33 (page 123).

Si l'on représente par E la peroxydase ou l'hématine, et par AH₂ le gaïacol, on peut écrire :



où K représente la constante de stabilité du complexe.

Si l'on appelle ΔA_λ la variation d'absorbance à une longueur d'onde λ , $\Delta \epsilon_{(E \cdot AH_2 - E)_\lambda}$ la différence des coefficients d'extinction moléculaire, à cette longueur d'onde, du complexe et de la peroxydase "libre" ou de l'hématine "libre", $[E]_0$ la concentration "totale" en peroxydase ou en hématine, on peut facilement montrer que :

$$\frac{1}{\Delta A_\lambda} = \frac{1}{\Delta \epsilon_{(E \cdot AH_2 - E)_\lambda} \cdot [E]_0} + \frac{1}{K \cdot \Delta \epsilon_{(E \cdot AH_2 - E)_\lambda} \cdot [E]_0 \cdot [AH_2]}$$

Les tracés de $\frac{1}{\Delta A_\lambda}$ en fonction de $\frac{1}{[AH_2]}$ doivent donc être des droites coupant l'axe des $\frac{1}{[AH_2]}$ en un point d'abscisse - K. Ces tracés, relatifs à la peroxydase et à l'hématine, sont représentés respectivement dans les schémas C et D

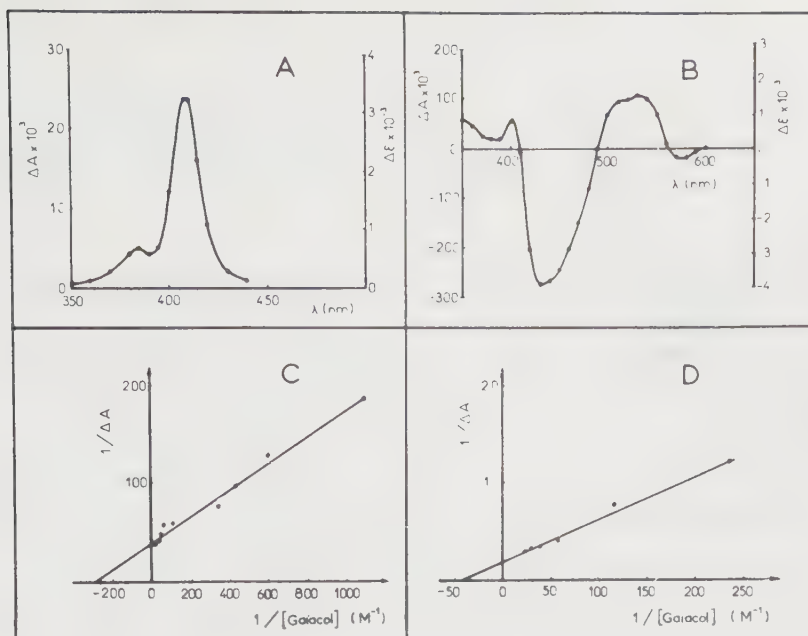


Figure 33

Mise en évidence d'un complexe peroxydase-gaïacol et d'un complexe hématine-gaïacol. Détermination des constantes d'équilibre de ces complexes.

A. Spectre de différence peroxydase-gaïacol — peroxydase.

La quantité de peroxydase P_2 dans le milieu réactionnel est de 0,03 μmole ; le volume final est de 3,5 ml; le pH (tampon phosphate de sodium 0,05 M) de 7. Le composé peroxydase gaïacol est obtenu en introduisant dans la solution de peroxydase 125 μmole de gaïacol.

B. Spectre de différence hématine gaïacol - hématine.

La quantité d'hématine dans le milieu réactionnel est de 0,472 μmole ; le volume final est de 3,5 ml; le pH (tampon phosphate de sodium 0,05 M) de 7. Le composé hématine-gaïacol est obtenu en introduisant dans la solution d'hématine 150 μmole de gaïacol.

Figure 33 (suite)

C. Variation de l'inverse de $\Delta A_{(E.gaiacol - E)_\lambda}$ en fonction de l'inverse de la concentration en gaiacol.

E correspond à la peroxydase et $\lambda = 408$ nm.

D. Variation de l'inverse de $\Delta A_{(E.gaiacol - E)_\lambda}$ en fonction de l'inverse de la concentration en gaiacol.

E correspond à l'hématine et $\lambda = 430$ nm.

de la figure 33 (page 123). Ils sont effectivement linéaires. L'ordonnée à l'origine β de ces droites est égale à

$$\beta = \frac{1}{\Delta\epsilon_{(E \cdot AH_2 - E)_\lambda} \cdot [E]_0}$$

La détermination de β à une longueur d'onde λ et la connaissance de $[E]_0$, permettent de calculer $\Delta\epsilon_{(E \cdot AH_2 - E)_\lambda}$. La concentration en peroxydase ou en hématine complexée au gaïacol peut être calculée par la relation

$$[E \cdot AH_2] = \frac{\Delta A_\lambda}{\Delta\epsilon_{(E \cdot AH_2 - E)_\lambda}}$$

Cette valeur permet alors, à chaque longueur d'onde, de déterminer $\Delta\epsilon_{(E \cdot AH_2 - E)_\lambda}$. Ces déterminations sont portées sur les spectres de différence A et B de la figure 33 (page 123). Les constantes de stabilité des complexes peroxydase - gaïacol et hématine - gaïacol sont respectivement $300 \pm 20 \text{ M}^{-1}$ et $45 \pm 5 \text{ M}^{-1}$.

Ces résultats ne sont pas sans analogie avec ceux que nous avons obtenus (129) avec l'acide β -indolylbutyrique et ceux obtenus par NUNEZ (130) et BJORKSTEN (131) avec l'iode. Ils permettent d'affirmer que la peroxydase peut former des complexes stables avec divers donneurs d'électrons.

Le complexe peroxydase-gaïacol mis en évidence peut être actif dans la réaction d'oxydation peroxydative, ou inactif (complexe de type abortif). Nous allons répondre

à cette question en considérant la cinétique de la réaction à l'état stationnaire.

2) Cinétique à l'état stationnaire.

A. Mécanisme réactionnel enzymatique.

D'après le modèle réactionnel proposé à la page 120, la seule réaction catalysée par la peroxydase correspond à l'oxydation du gaïacol en bi-radical D (équation [29], page 120). Cette réaction enzymatique à deux substrats et un produit (réaction bi-uni selon la terminologie de CLELAND (132)) s'effectue en plusieurs étapes. Le modèle décrivant la succession de ces étapes peut être établi à l'aide d'une étude cinétique, si les mesures de vitesse correspondent à la réaction enzymatique seule. Ces mesures sont effectivement rendues possibles par l'observation de l'augmentation d'absorbance du milieu réactionnel à 470 nm, due à l'apparition de $\mathcal{S}$. On peut en effet considérer que la vitesse de la réaction enzymatique est proportionnelle à l'augmentation d'absorbance en fonction du temps si l'on fait les deux hypothèses suivantes :

- seul le produit $\mathcal{S}$ absorbe à 470 nm ;
- les réactions radicalaires correspondant à la transformation non enzymatique de D en $\mathcal{S}$ sont beaucoup plus rapides que la réaction enzymatique d'oxydation du gaïacol en D. En d'autres termes, la vitesse de la réaction enzymatique de formation de D est limitante et conditionne l'apparition de $\mathcal{S}$.

La première hypothèse est plausible car aucun des précurseurs de $\mathcal{S}$ décrits dans le mécanisme proposé (page 109) n'absorbe à 470 nm. En effet, l'absorption dans le visible de l'orthobenzoquinone (formule H', page

111), qui est le seul précurseur susceptible d'absorber dans cette région du spectre, peut être considérée comme négligeable à cette longueur d'onde (133).

La seconde hypothèse est également acceptable car la plupart des réactions radicalaires connues sont très rapides à la température ambiante. De plus, nous avons déjà remarqué (page 115) que la vitesse d'apparition de $\mathcal{S}$ est proportionnelle à la concentration en peroxydase, ce qui montre bien que c'est la réaction enzymatique qui est limitante.

Compte tenu des résultats exposés précédemment, le modèle enzymatique que nous allons essayer d'établir doit rendre compte des points suivants :

- chaque molécule de gaïacol oxydé nécessite l'utilisation d'une molécule d'eau oxygénée; ceci se traduit par l'égalité des coefficients de stoechiométrie des réactifs (réaction [29], page 120);
- seule la réaction [30] (page 120) de formation du bi-radical D est enzymatique;
- la réaction radicalaire [30] (page 120) est beaucoup plus rapide que la réaction enzymatique [29] (page 120);
- l'étape de libération du produit D est pratiquement irréversible en raison de la grande réactivité de ce produit qui ne peut s'accumuler dans le milieu réactionnel;
- la peroxydase peut former un complexe stable avec le gaïacol, ce complexe pouvant être actif ou inactif (abortif);

- la peroxydase peut former un complexe actif (donc non abortif) avec l'eau oxygénée (composé I).

De manière tout à fait classique, on peut, à priori, imaginer deux types de modèles théoriques susceptibles de rendre compte de ces résultats.

- Des modèles dans lesquels on suppose que, au cours d'une première étape, la peroxydase peut fixer "au hasard" un substrat (gaïacol ou eau oxygénée) pour former un complexe binaire actif. La deuxième étape correspond alors à la fixation du deuxième substrat sur ce complexe pour donner un complexe ternaire actif entre la peroxydase et ses deux substrats (modèle 1 de la figure 34, page 128). Comme nous ne savons pas si le complexe peroxydase-gaïacol, mis directement en évidence dans le paragraphe précédent, est actif ou non, on peut très bien supposer que la peroxydase peut fixer le gaïacol sur deux sites différents, l'un actif, l'autre inactif. Par contre, une telle supposition ne peut être formulée pour l'eau oxygénée. L'existence d'un complexe abortif peroxydase-gaïacol rend plausible un modèle "au hasard", identique au modèle 1 de la figure 34 (page 128), mais dans lequel on aurait une étape supplémentaire correspondant à la formation de ce complexe (modèle 2 de la figure 34, page 128).

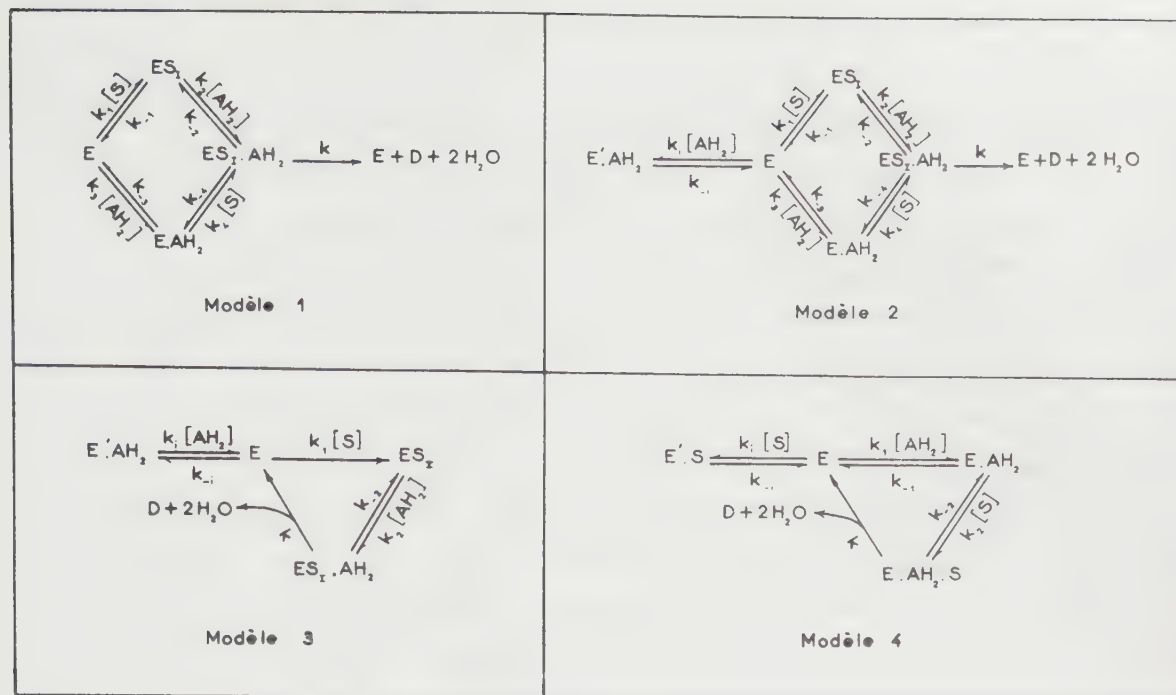


Figure 34

Différents modèles proposés susceptibles d'expliquer l'oxydation du gaïacol par le système "peroxydase P_2 de Raifort - eau oxygénée".

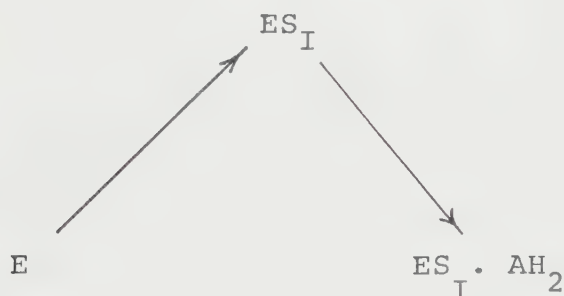
Dans ces modèles, E, S, AH_2 , ES_I , $E.AH_2$, $E'S$, $E'.AH_2$, $ES_I.AH_2$ ou $E.AH_2.S$, D correspondent respectivement à l'enzyme libre, l'eau oxygénée, le gaïacol, le composé I, un complexe peroxydase-gaïacol actif, un complexe peroxydase-eau oxygénée abortif, un complexe ternaire peroxydase-eau oxygénée-gaïacol actif, le produit de la réaction (bi-radical défini page 109).

- Des modèles ordonnés* pour lesquels on admet que, dans la première étape, la peroxydase fixe exclusivement un des deux substrats et forme un complexe binaire actif. La fixation de ce premier substrat provoque alors une modification de conformation de l'enzyme (induced fit) qui permet au second substrat de se fixer à son tour pour donner un complexe ternaire actif. Pour rendre compte du fait que chacun des deux substrats peut se fixer directement sur l'enzyme libre, il faut alors admettre dans ces modèles linéaires, que le deuxième substrat forme avec l'enzyme libre un complexe abortif, c'est à dire un complexe situé en dehors de la séquence réactionnelle (modèles 3 et 4 de la figure 34, page 128).

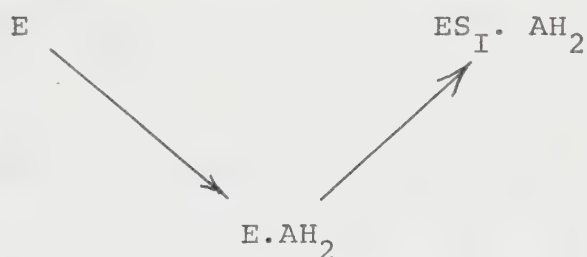
Il est facile de faire un choix entre ces quatre modèles en considérant la forte réactivité de la peroxydase vis à vis de l'eau oxygénée. Cette forte réactivité permet en effet d'éliminer d'emblée le modèle 4 puisque nous venons de voir que le complexe E'S ne peut être abortif. Par ailleurs, si l'affinité de l'eau oxygénée pour la peroxydase est extrêmement grande, celle du gaïacol

* Un modèle ordonné est un modèle mettant en jeu plusieurs substrats qui se fixent séquentiellement sur l'enzyme avant la libération du (ou des) produit(s). Il est important de remarquer qu'un modèle linéaire de type "ping-pong" ne peut être postulé car un tel modèle suppose la libération d'au moins deux produits. En effet, un modèle linéaire ping-pong est un modèle mettant en jeu plusieurs substrats qui se fixent successivement sur l'enzyme et dans lequel plusieurs produits sont libérés, certains l'étant avant la fixation de tous les substrats.

par contre, est relativement faible puisque la valeur de sa constante d'affinité, déterminée précédemment (page 124) l'est aussi. Dans ces conditions, la concentration du complexe ES_I (composé I) sera toujours très supérieure à celle du complexe $E \cdot AH_2$ (complexe peroxydase - gaïacol). Il en résulte que la voie réactionnelle



est prépondérante devant la voie réactionnelle



qui peut alors être négligée. Ces considérations permettent d'écarter les modèles au hasard (modèles 1 et 2 de la figure 34, page 128).

Nous sommes donc conduits à l'idée que le modèle linéaire ordonné N° 3 (figure 34, page 128) est le seul qui puisse être en accord, à priori, avec les résultats de l'étude spectrophotométrique que nous venons d'exposer. Nous considérerons donc uniquement les implications cinétiques de ce mécanisme.

L'équation de vitesse fournie par ce modèle supposé à l'état stationnaire, est donnée par la relation

$$\frac{[E]_0}{v} = \phi_0 + \frac{\phi_1}{[S]} + \frac{\phi_2}{[AH_2]} + \phi_{12}^i \frac{[AH_2]}{[S]} \quad [31]$$

Dans cette équation, $[E]_0$ représente la concentration totale de la peroxydase, $[S]$ et $[AH_2]$ les concentrations respectives de l'eau oxygénée et du gaïacol, v la vitesse initiale d'oxydation, ϕ_0 , ϕ_1 , ϕ_2 , ϕ_{12}^i les coefficients cinétiques de DALZIEL (82). Les expressions des ϕ en fonction des constantes de vitesse du modèle 3 (figure 34, page 128) sont représentées dans le tableau VII de la page 132. On voit très facilement que la fonction $\frac{[E]_0}{v} = f\left(\frac{1}{[S]}\right)$ (équation [31]) est une droite ne passant pas par l'origine. Une étude de fonction permet de montrer que la fonction $\frac{[E]_0}{v} = f\left(\frac{1}{[AH_2]}\right)$ est une hyperbole admettant une asymptote oblique d'équation

$$\frac{[E]_0}{v} = \phi_0 + \frac{\phi_1}{[S]} + \frac{\phi_2}{[AH_2]} \quad [32]$$

et l'axe des ordonnées pour asymptote verticale. Lorsque $\frac{1}{[AH_2]}$ est grand (concentrations faibles en gaïacol), la fonction, qui se confond avec son asymptote oblique, est une droite d'équation [32]. Lorsque $\frac{1}{[AH_2]}$ décroît, $\frac{[E]_0}{v}$ décroît et passe par un minimum tel que :

ϕ_0	ϕ_1	ϕ_2	ϕ_{12}^i
$\frac{1}{k}$	$\frac{1}{k_1}$	$\frac{1}{k_2} + \frac{1}{k \cdot K_2}$	$\frac{1}{k_1} \times K_i$

TABLEAU VII

Signification des coefficients de DALZIEL (82) qui
interviennent dans l'équation de vitesse [31] (page 131)

Dans ce tableau $K_2 = \frac{k_2}{k_{-2}}$ et $K_i = \frac{k_i}{k_{-i}}$

$$\left(\frac{[E]_0}{v} \right)_{\min} = \phi_0 + 2 (\phi_2 \cdot \phi_{12}^i)^{1/2} \times \frac{1}{[S]^{1/2}} + \frac{\phi_1}{[S]} \quad [33]$$

$$\text{et } \left(\frac{1}{[AH]} \right)_{\min} = (\phi_{12}^i / \phi_2)^{1/2} \times \frac{1}{[S]^{1/2}} \quad [34]$$

Il nous faut maintenant confronter les expressions théoriques aux résultats expérimentaux.

B. Résultats expérimentaux.

- Les tracés primaires $\frac{[E]_0}{v} = f\left(\frac{1}{[AH_2]}\right)$ de LINEWEAVER-BURK (106), représentés dans la figure 35 A (page 134), sont en accord avec la relation [31] (page 131). Ces tracés sont, comme prévu par l'équation [32] (page 131), linéaires dans la région où $\frac{1}{[AH_2]}$ est grand (faibles concentrations en gaïacol).

Les tracés secondaires* correspondant à ces tracés primaires sont représentés dans les figures 35 B, 35 C, 35 D, (page 134). L'équation [32] prévoit que la pente des portions linéaires des tracés primaires

* Les tracés secondaires sont des tracés obtenus à partir de données fournies par les tracés primaires. Dans ce cas nous pouvons obtenir quatre types de tracés secondaires correspondant à la variation, en fonction de la concentration en eau oxygénée, de :

- 1) la pente des portions linéaires des tracés primaires ;
- 2) l'ordonnée à l'origine des portions linéaires des tracés primaires ;
- 3) l'ordonnée du minimum des tracés primaires ;
- 4) l'abscisse du minimum des tracés primaires.

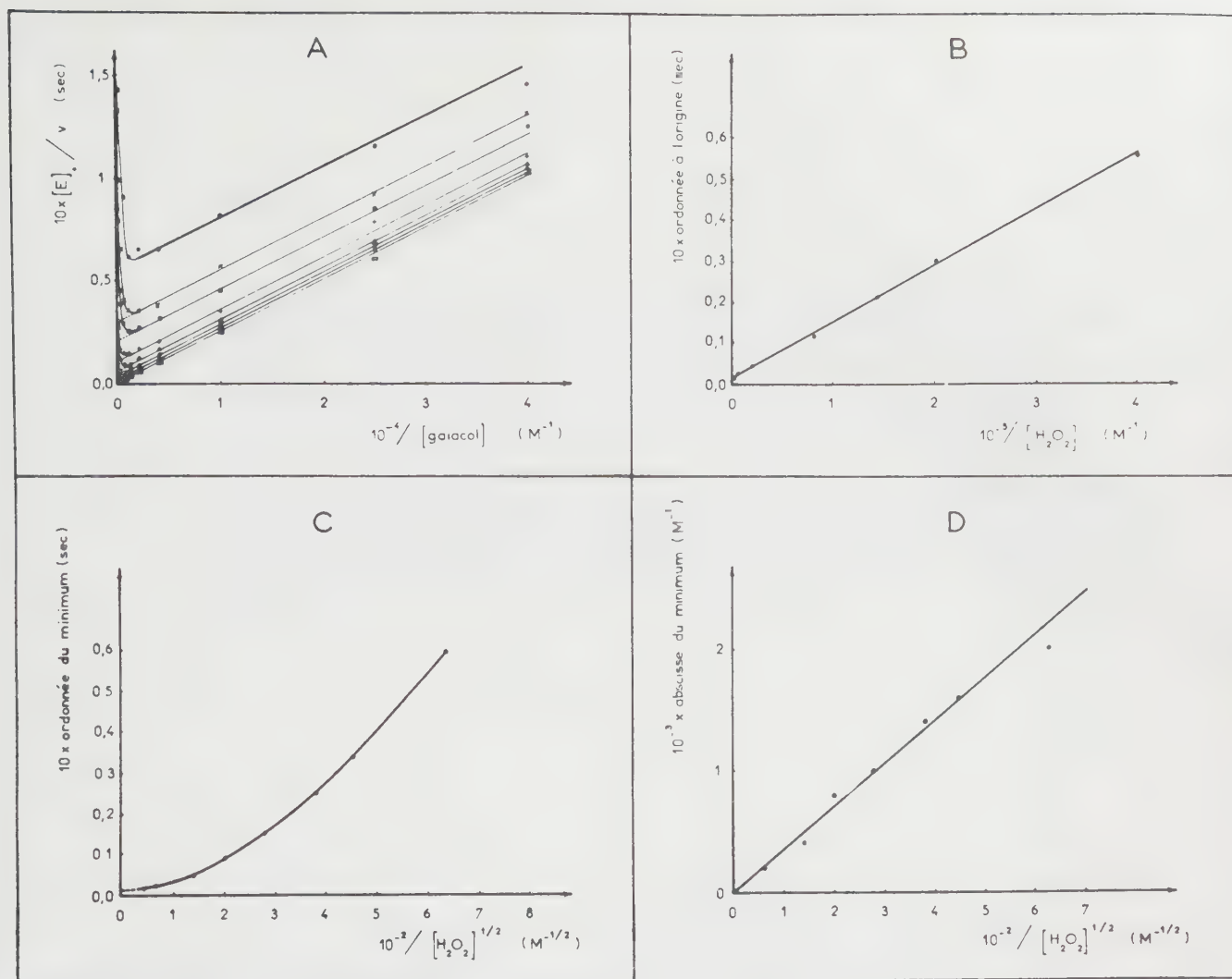


Figure 35

Tracés primaires $[E]_0 / v = f(1/[galacol])$ et tracés secondaires correspondants.

- A. Effets de l'eau oxygénée sur les tracés primaires obtenus en fonction du galacol. Les concentrations de l'eau oxygénée sont respectivement de $2,5 \cdot 10^{-6}$ M ($\bullet$), $5 \cdot 10^{-6}$ M ($\times$), $7 \cdot 10^{-6}$ M ($\square$), $1,25 \cdot 10^{-5}$ M ($+$), $2,5 \cdot 10^{-5}$ M (Δ), $5 \cdot 10^{-5}$ M ($\circ$), $2,5 \cdot 10^{-4}$ M (∇), $5 \cdot 10^{-4}$ M ($\ominus$).

La concentration de la peroxydase P_2 est de $1,28 \cdot 10^{-8}$ M. Les mesures sont effectuées à pH 7,0 (tampon phosphate de sodium 0,2 M).

- B. Variation de l'ordonnée à l'origine des portions linéaires des tracés primaires $[E]_0 / v = f(1/[galacol])$ en fonction de l'inverse de la concentration en eau oxygénée.

.../...

Figure 35 (suite)

- C. Variation de l'ordonnée du minimum des tracés primaires $[E]_0/v = f(1/[gaïacol])$ en fonction de l'inverse de la racine carrée de la concentration en eau oxygénée.
- D. Variation de l'abscisse du minimum des tracés primaires $[E]_0/v = f(1/[gaïacol])$ en fonction de l'inverse de la racine carrée de la concentration en eau oxygénée.

$\frac{[E]_0}{v} = f\left(\frac{1}{[AH_2]}\right)$ est constante, ce qui est vérifié expérimentalement (figure 35 A, page 134). Ces tracés permettent de déterminer ϕ_2 (tableau VIII, page 136). L'équation [32] prévoit également que la variation de l'ordonnée à l'origine des portions linéaires des tracés primaires,

$\frac{[E]_0}{v} = f\left(\frac{1}{[AH_2]}\right)$, en fonction de la concentration en eau oxygénée est une droite ne passant pas par l'origine et d'équation :

$$O.O. = \phi_0 + \frac{\phi_1}{[S]} \quad [35]$$

La figure 35 B (page 134) montre qu'il en est bien ainsi. Ce tracé permet de déterminer ϕ_0 et ϕ_1 (tableau VIII, page 136). La variation en fonction de $\frac{1}{[S]^{1/2}}$ de l'ordonnée du minimum des tracés primaires

$\frac{[E]_0}{v} = f\left(\frac{1}{[AH_2]}\right)$ est représentée dans la figure 35 C (page 134). La courbe obtenue a bien l'allure parabolique* prévue par l'équation [33] (page 133). L'intersection de la parabole avec l'axe des ordonnées, par extrapolation de la courbe, permet d'obtenir une valeur approchée de ϕ_0 (tableau VIII, page 136). La variation, en fonction de $\frac{1}{[S]^{1/2}}$ de l'abscisse du minimum des tracés primaires $\frac{[E]_0}{v} = f\left(\frac{1}{[AH_2]}\right)$ est représentée dans la figure 35 D (page 134). On obtient bien une droite passant par l'origine correspondant à l'équation [34] (page 133) et dont la pente permet de calculer le

* Nous démontrerons par la suite (page 140) que cette courbe est bien une parabole.

	Valeur	Numéro de la figure permettant de tirer cette valeur
ϕ_o	$1,4. 10^{-3}$ sec.	35 B
	$1,2. 10^{-3}$ sec.	36 E
	$1,5. 10^{-3}$ sec.	35 C
ϕ_1	$1,37. 10^{-7}$ M. sec.	35 B
	$1,25. 10^{-7}$ M. sec.	36 D
ϕ_2	$2,45. 10^{-6}$ M. sec.	35 A
	$2,58. 10^{-6}$ M. sec.	36 E
ϕ_{12}^i	$0,30. 10^{-4}$ sec.	36 D
$\frac{\phi_{12}^i}{\phi_2}$	12,25 M	35 D

TABLEAU VIII

Valeurs numériques des coefficients de DALZIEL (82) qui interviennent dans l'équation de vitesse [31] (page 131)

rapport ϕ_{12}^1/ϕ_2 (tableau VIII, page 136)

- Les tracés primaires $\frac{[E]_0}{v} = f\left(\frac{1}{[S]}\right)$ de LINEWEAVER-BURK (109) sont représentés dans les figure 36 A,B,C, (page 138). Les tracés sont bien linéaires, comme le prévoit l'équation [31] (page 131), mais seulement pour des concentrations en gaïacol inférieures à $2 \cdot 10^{-3}$ M. Pour les concentrations supérieures, les tracés sont encore linéaires mais uniquement lorsque le rapport $R = [H_2O_2]/[Gaïacol]$ est supérieur à 1/800. Lorsque la concentration en gaïacol est supérieure à $2 \cdot 10^{-3}$ M, les droites s'infléchissent vers le haut dès que le rapport R devient inférieur à 1/800. Cette inflexion peut très bien s'expliquer par le modèle réactionnel présenté à la page 120. En effet, l'étude spectrophotométrique réalisée plus haut (pages 94 et 115) a permis de montrer que le produit d'oxydation $\mathcal{I}$ est fortement absorbant à la longueur d'onde où sont effectuées les mesures cinétiques (470 nm). Sous l'action du gaïacol en excès, $\mathcal{I}$ se transforme en un produit P_G incolore et l'augmentation d'absorbance en fonction du temps que nous mesurons correspond dans ce cas à la somme des deux effets contraires suivants :

. augmentation d'absorbance due à la réaction enzymatique de formation de $\mathcal{I}$;

. diminution d'absorbance due à la transformation non enzymatique de $\mathcal{I}$ en P_G (qui est incolore). Il en résulte que la vitesse nette de formation de $\mathcal{I}$ que nous mesurons est plus faible que la vitesse de la réaction enzymatique. Les valeurs de $\frac{[E]_0}{v}$ mesurées lorsque R est inférieur à 1/800 sont donc supérieures à celles que l'on aurait si la réaction non enzymatique n'avait pas lieu. Le modèle 3 de la figure 34 (page 128) prévoit des tracés

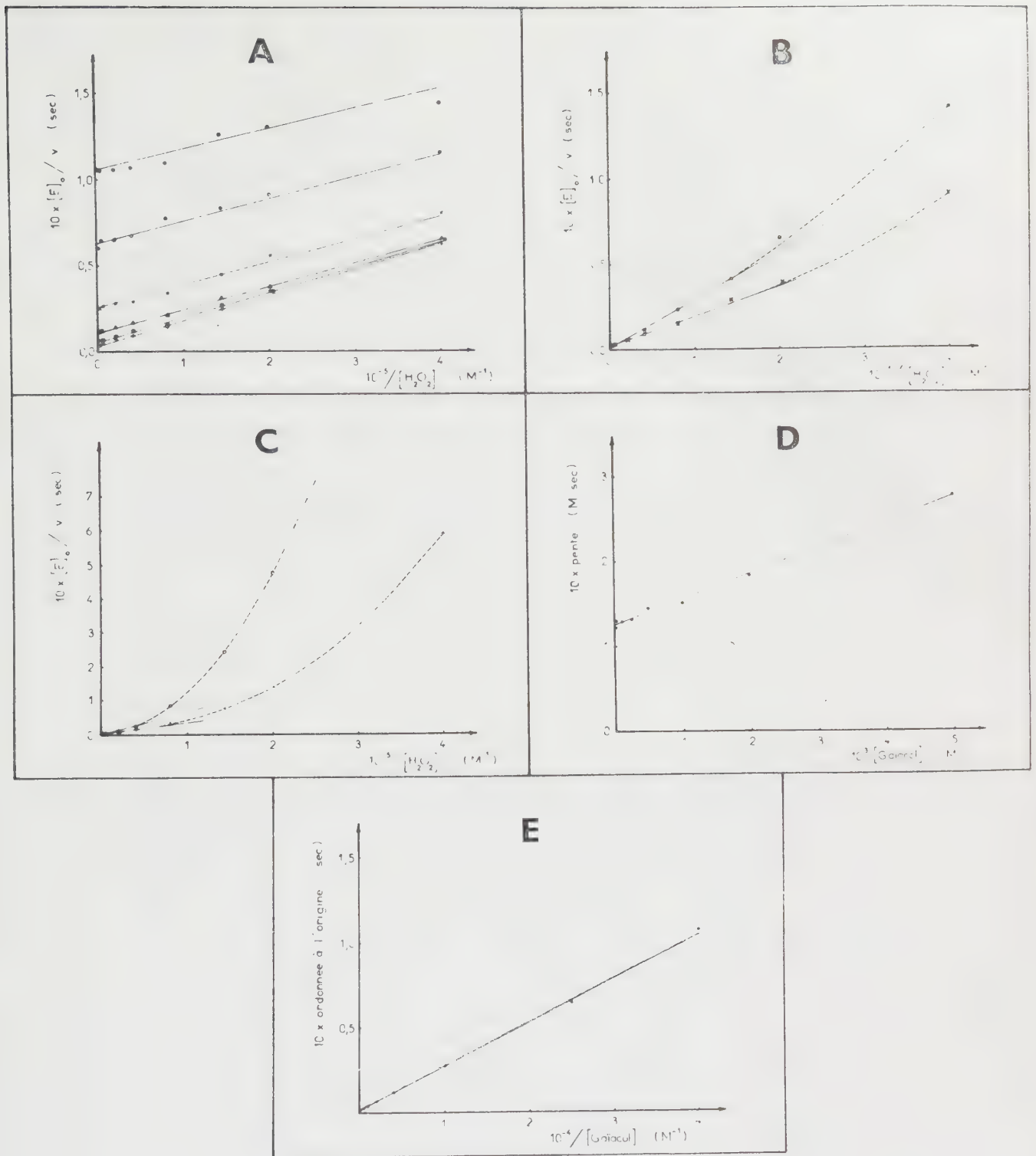


Figure 36

Tracés primaires $[E]_0 / v = f(1/[H_2O_2])$ et tracés secondaires correspondants.

A. Effets du gallicol sur les tracés primaires obtenus en fonction de l'eau oxygénée. Les concentrations du gallicol

Figure 36 (suite)

sont respectivement de $2,5 \cdot 10^{-5}$ M ($\bullet$), $4 \cdot 10^{-5}$ M (o), 10^{-4} M (x), $2,5 \cdot 10^{-4}$ M ($\blacktriangle$), $5 \cdot 10^{-4}$ M ($\blacksquare$), 10^{-3} M (+).

- B. Effets du gaïacol sur les tracés primaires obtenus en fonction de l'eau oxygénée. Les concentrations du gaïacol sont respectivement de $2 \cdot 10^{-3}$ M ($\square$), $5 \cdot 10^{-3}$ M (x).
- C. Effets du gaïacol sur les tracés primaires obtenus en fonction de l'eau oxygénée. Les concentrations du gaïacol sont respectivement de 10^{-2} M (o), $2,5 \cdot 10^{-2}$ M (+).
- D. Variation de la pente des portions linéaires des tracés primaires $[E]_0/v = f(1/[H_2O_2])$ en fonction de la concentration en gaïacol.
- E. Variation de l'ordonnée à l'origine des portions linéaires des tracés primaires $[E]_0/v = f(1/[H_2O_2])$ en fonction de l'inverse de la concentration en gaïacol.

primaires $\frac{[E]_0}{v} = f\left(\frac{1}{[S]}\right)$ linéaires. Dès que la réaction non enzymatique commence, les points expérimentaux, correspondant aux valeurs de $\frac{[E]_0}{v}$ mesurées, sont donc situés au dessus de ces droites, ce qui explique l'inflexion de ces dernières vers le haut lorsque R devient inférieur à 1/800. Les portions non linéaires de ces tracés ne sont donc pas à prendre en considération pour l'analyse des résultats fournis par la cinétique. L'élimination des parties curvilignes revient à supprimer un certain nombre de points expérimentaux qu'il faut aussi éliminer sur les tracés primaires $\frac{[E]_0}{v} = f\left(\frac{1}{[AH_2]}\right)$. Il est important de remarquer que cette élimination ne modifie pas ces derniers tracés dont le minimum reste très apparent.

La valeur du rapport R (1/800) que l'on peut déterminer par la cinétique enzymatique, et au dessous de laquelle P_G commence à se former, est inférieure à celle (1/200) déterminée par l'étude spectrophotométrique faite précédemment (figure 26, page 94). Ceci s'explique par le fait que la vitesse est mesurée au début de la réaction, c'est à dire lorsque la concentration en produit $\mathcal{P}$ est très faible. La vitesse de transformation de $\mathcal{P}$ en P_G étant proportionnelle à la concentration en $\mathcal{P}$, l'action du gaïacol est donc plus nette sur le spectre de $\mathcal{P}$ (qui est enregistré à l'équilibre, lorsque la concentration en $\mathcal{P}$ est maximum) que sur la vitesse initiale de la réaction (qui est mesurée au moment où la concentration en $\mathcal{P}$ est négligeable). Pour pouvoir observer un effet du gaïacol sur la vitesse initiale, il faut donc que l'on ait un rapport R plus faible que celui qui est nécessaire pour observer le même effet sur le spectre de $\mathcal{P}$.

Les tracés secondaires correspondant aux portions linéaires des tracés primaires $\frac{[E]_0}{v} = f\left(\frac{1}{[S]}\right)$ sont représentés dans les figures 36 D et E (page 138). L'équation [31] (page 131) prévoit que la pente de ces tracés primaires a pour équation celle d'une droite ne passant pas par l'origine :

$$P = \phi_1 + \phi_{12}^i [AH_2] \quad [36]$$

La figure 36 D (page 138) montre que la relation [36] est vérifiée et le tracé permet de déterminer les coefficients de DALZIEL ϕ_1 et ϕ_{12}^i (tableau VIII, page 136). L'équation [31] prévoit également que l'ordonnée à l'origine des tracés primaires $\frac{[E]_0}{v} = f\left(\frac{1}{[S]}\right)$ a pour équation celle d'une droite ne passant pas par l'origine soit :

$$O.O. = \phi_0 + \frac{\phi_2}{[AH_2]} \quad [37]$$

La figure 36 E (page 138) montre que cette dernière relation est également vérifiée. Ce tracé permet de déterminer les coefficients de DALZIEL ϕ_0 et ϕ_2 (tableau VIII, page 136).

Il est possible de vérifier numériquement que la courbe 35 C (page 134) a bien l'allure parabolique prévue par l'équation [33] (page 133), en utilisant les valeurs de ϕ_0 et de ϕ_1 correspondant à la moyenne des valeurs données* dans le tableau VIII (page 136). Cette vérification est extrêmement simplifiée si l'on remarque que cette équation peut se mettre sous la forme :

$$\frac{[E]_0}{v} - \phi_0 - \frac{\phi_1}{[S]} = 2(\phi_2 \cdot \phi_{12}^i)^{1/2} \times \frac{1}{[S]^{1/2}} \quad [38]$$

* La valeur de ϕ_0 fournie par la figure 35 C (page 134), n'étant que très approximative, n'est pas prise en considération pour le calcul de la valeur moyenne de ce paramètre.

Si l'on pose

$$Y = \frac{[E]_0}{v} - \phi_0 - \frac{\phi_1}{[S]} \quad [39]$$

L'équation [38] peut alors s'écrire :

$$Y = 2 (\phi_2 \cdot \phi_{12}^i)^{1/2} \times \frac{1}{[S]^{1/2}} \quad [40]$$

On voit que la fonction de $Y = f(\frac{1}{[S]^{1/2}})$ est l'équation d'une droite passant par l'origine. La figure 37 (page 142) montre que cette relation est vérifiée. La pente de cette droite permet de déterminer le produit $\phi_2 \cdot \phi_{12}^i$. La valeur obtenue ($0,548 \cdot 10^{-10} \text{ M} \cdot \text{sec}^2$) est en bon accord avec celle calculée à partir des données du tableau VIII, page 136, soit $0,732 \cdot 10^{-10} \text{ M} \cdot \text{sec}^2$.

Les valeurs des coefficients cinétiques de DALZIEL reportés dans le tableau VIII permettent de calculer les constantes de vitesse k et k_1 soit :

$$k = 725 \text{ à } 830 \text{ sec}^{-1}$$

$$k_1 = 7,3 \text{ à } 8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$$

Les valeurs de k_1 et de ϕ_{12}^i (tableau VIII, page 136) permettent de déterminer K_i soit :

$$K_i = 240 \text{ à } 219 \text{ M}^{-1}$$

Cette valeur de la constante d'affinité du galacol pour la peroxydase fournie par la cinétique à l'état stationnaire, est peu différente de celle (300 M^{-1}) déterminée par spectrophotométrie différentielle (page 124). Cette concordance constitue une vérification supplémentaire du modèle proposé.

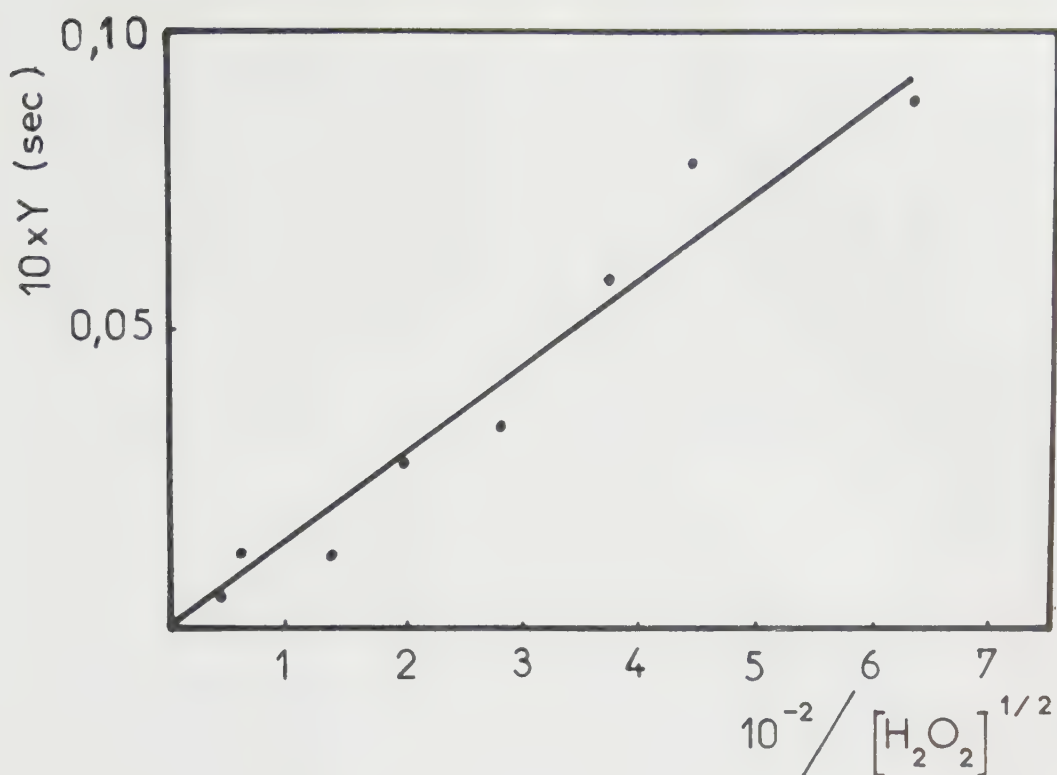


Figure 37

Effets de l'eau oxygénée sur l'ordonnée du minimum des tracés primaires $[\underline{E}]_0/v = f(1/[\text{galacol}])$.

La grandeur Y est donnée par la relation

$$Y = ([\underline{E}]_0/v)_{\min} - \phi_0 - \phi_1/[\text{H}_2\text{O}_2]$$

ϕ_0 et ϕ_1 étant des paramètres de DALZIEL définis par l'équation [31] (page 131).

Le tableau VIII (page 132) montre que nous disposons de quatre relations permettant de définir cinq grandeurs : k , k_1 , k_2 , K_2 , K_1 . Pour déterminer toutes ces constantes, il nous faudrait une relation supplémentaire. La relation de HALDANE (134), généralement utilisée dans des cas similaires, n'est pas utilisable. En l'appliquant à la réaction enzymatique correspondant au modèle 3 (page 128), on peut écrire

$$\Gamma = \frac{k_1 \quad k_2 \quad k}{k_{-1} \quad k_{-2} \quad k'} \quad *$$

Dans cette expression, Γ représente la constante d'équilibre de la réaction enzymatique (réaction [29] , page 120), k' la constante de vitesse de l'étape



et k_{-1} la constante de vitesse de l'étape



Le bi-radical D ne pouvant être détecté dans le milieu réactionnel, la constante d'équilibre Γ ne peut pas être déterminée. La relation de HALDANE est donc inutilisable comme relation supplémentaire entre les constantes. Par ailleurs l'utilisation de cette relation ferait apparaître deux nouvelles constantes de vitesse (k_{-1} et k') qui, pour être déterminées, nécessiteraient deux autres relations supplémentaires.

* La constante d'équilibre Γ de la réaction strictement enzymatique [29] (page 120) est différente de la constante d'équilibre K de la réaction globale [22] (page 119).

Si nous ne sommes pas en mesure de déterminer toutes les constantes de vitesse du modèle, nous pouvons cependant trouver la valeur maxima de certaines constantes définies dans le tableau VII (page 132). En effet, l'expression de ϕ_2 étant donnée par la relation :

$$\phi_2 = \frac{1}{k_2} + \frac{1}{k K_2} ,$$

on peut écrire les deux inéquations suivantes :

$$\frac{1}{k_2} \leq \phi_2$$

$$\frac{1}{K_2} \leq k \phi_2$$

D'où l'on tire

$$k_2 \geq 3,88 \text{ à } 4,08 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$$

$$K_2 \geq 571 \text{ à } 465 \text{ M}^{-1} \quad [41]$$

Or les phénomènes de diffusion imposent la relation

$$k_2 \leq 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1} \quad [42]$$

Les inéquations [41] et [42] donnent alors

$$k_{-2} \leq 1,75 \cdot 10^6 \text{ sec}^{-1}$$

C - Discussion et conclusions

Le modèle réactionnel adopté (modèle 3, page 128)

a été vérifié de différentes manières.

- Tous les tracés primaires et secondaires sont en accord avec l'équation de vitesse fournie par ce modèle (équation 31, page 131).

- Les différents tracés permettant de déterminer un même paramètre fournissent une même valeur de ce paramètre.

- La constante d'affinité du gaïacol pour la peroxydase, trouvée par la cinétique à l'état stationnaire, est peu différente de celle déterminée par spectrophotométrie différentielle.

- La valeur de la constante de vitesse k_1 obtenue par la cinétique à l'état stationnaire ($k_1 = 7,3$ à $8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$) est très voisine de celle mesurée par la technique d'écoulement interrompu (16) par CHANCE (50, 135, 136) qui trouva $8,9 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ à 25°C . Il est très important de remarquer que cette valeur de k_1 dépend du modèle adopté et que les modèles dans lesquels il est supposé que la molécule d'eau oxygénée oxyde deux molécules de gaïacol, auraient fourni une valeur de k_1 deux fois plus faible, donc très différente de celle mesurée directement par CHANCE. Ceci constitue un argument supplémentaire permettant de rejeter les différents mécanismes proposés antérieurement pour l'oxydation du gaïacol par les peroxydases et en particulier les modèles relativement élaborés d'HOSOYA (figure 10, page 26).

Ces modèles ne conviennent pas pour plusieurs autres raisons.

- Ils ne permettent pas de rendre compte de la courbe de titrage du gaïacol par l'eau oxygénée en présence de peroxydase de raifort. Cette courbe prévoit en effet

que chaque mole d'eau oxygénée oxyde une seule mole de gaïacol alors que les modèles proposés par HOSOYA prévoient l'oxydation de deux moles de gaïacol.

- Ils ne font pas intervenir de complexe abortif peroxydase - gaïacol.

- Ils ne permettent pas d'interpréter les tracés primaires et secondaires que nous avons obtenus. Il faut noter, cependant, que les différences observées entre les tracés primaires obtenus par HOSOYA et les nôtres ne sont qu'apparentes et s'expliquent très bien si l'on remarque que les concentrations en gaïacol utilisées par HOSOYA sont beaucoup plus faibles que les nôtres et que leur domaine de variation est beaucoup plus étroit.

En définitive, le modèle enzymatique que nous proposons (modèle 3, page 128) prévoit trois étapes dans la séquence réactionnelle :

- Une première étape correspondant au transfert des équivalents oxydants de l'eau oxygénée sur l'enzyme avec formation du composé I;

- une deuxième étape correspondant à la fixation du gaïacol sur le composé I pour former un complexe ternaire peroxydase - eau oxygénée - gaïacol;

- une troisième étape dans laquelle les deux équivalents oxydants du composé I sont transférés sur le gaïacol.

Ce modèle suppose que le transfert s'effectue en une seule phase sans le passage transitoire par le composé II. Cette hypothèse a pour conséquence que le transfert électronique qui s'effectue au niveau du substrat (gaïacol) pour donner le bi-radical D (page 109) est un transfert électronique concerté.

Au terme du travail qui vient d'être exposé, nous sommes en mesure de présenter un mécanisme de l'oxydation du gaïacol par le système "isoperoxydase P_2 de Raifort - peroxyde", compatible avec le modèle enzymatique que nous proposons (modèle 3, page 128) et susceptible d'expliquer le rôle catalytique de la peroxydase. En utilisant la représentation schématique de la peroxydase et de ses composés proposée par CHANCE (137) et SAUNDERS (1), ce mécanisme peut être représenté par la séquence réactionnelle décrite dans la figure 38 (page 148).

Il est important de remarquer que nous ne disposons, à l'heure actuelle, d'aucun moyen permettant de vérifier, aussi bien au niveau du substrat que de l'enzyme, que le transfert des deux équivalents oxydants du composé I sur le gaïacol s'effectue bien en une seule phase. Cette absence de preuve ne permet pas d'écarter un modèle enzymatique (figure 39, page 149) supposant un transfert en deux phases.

- Les deux premières étapes de ce modèle correspondent respectivement, comme dans le modèle proposé (modèle 3, page 128), à la formation du composé I et du complexe ternaire peroxydase - eau oxygénée - gaïacol.

- Les deux étapes suivantes correspondent au transfert biphasique des deux équivalents oxydants du composé I sur le gaïacol avec participation du composé II dans la séquence réactionnelle.

Dans ce cas, le rôle catalytique de la peroxydase peut être décrit par le mécanisme représenté dans la figure 40 (page 150). L'expression de la vitesse fournie par ce modèle est formellement identique à celle (équation [31], page 131) fournie par le modèle proposé (modèle 3, page 128). Le tableau IX (page 151) montre cependant que la signi-

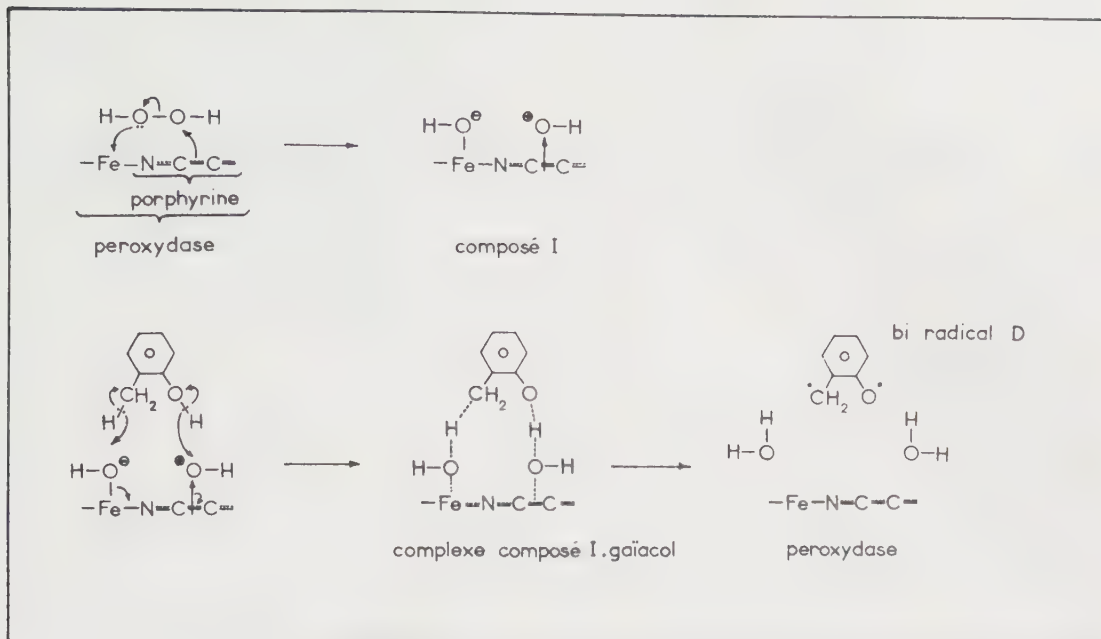


Figure 38

Mécanisme catalytique de l'oxydation du gaïacol par le système "peroxydase - eau oxygénée" ne faisant pas intervenir le composé II.

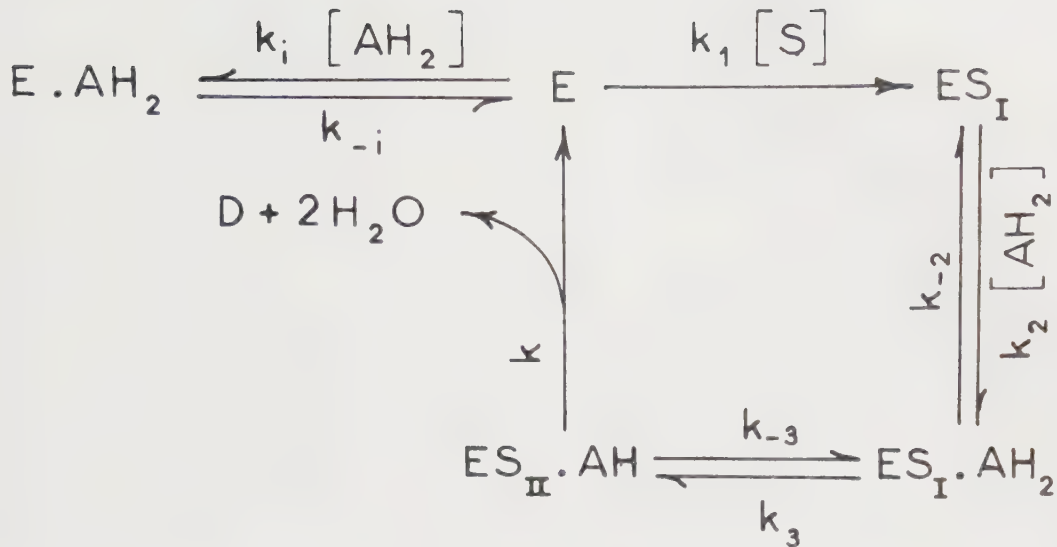


Figure 39

Modèle enzymatique susceptible d'expliquer l'oxydation du gaïacol par le système "peroxydase - eau oxygénée" supposant la participation du composé II.

Dans ce modèle, E, S, AH₂, ES_I, ES_I·AH₂, ES_{II}·AH, D, E·AH₂ représentent respectivement la peroxydase "libre", l'eau oxygénée, le donneur d'électrons sous sa forme réduite, le composé I, un complexe ternaire actif peroxydase-eau oxygénée-donneur d'électrons réduit, un complexe binaire actif composé II-donneur d'électrons à demi réduit, le produit d'oxydation, un complexe binaire abortif peroxydase-donneur d'électrons réduit.

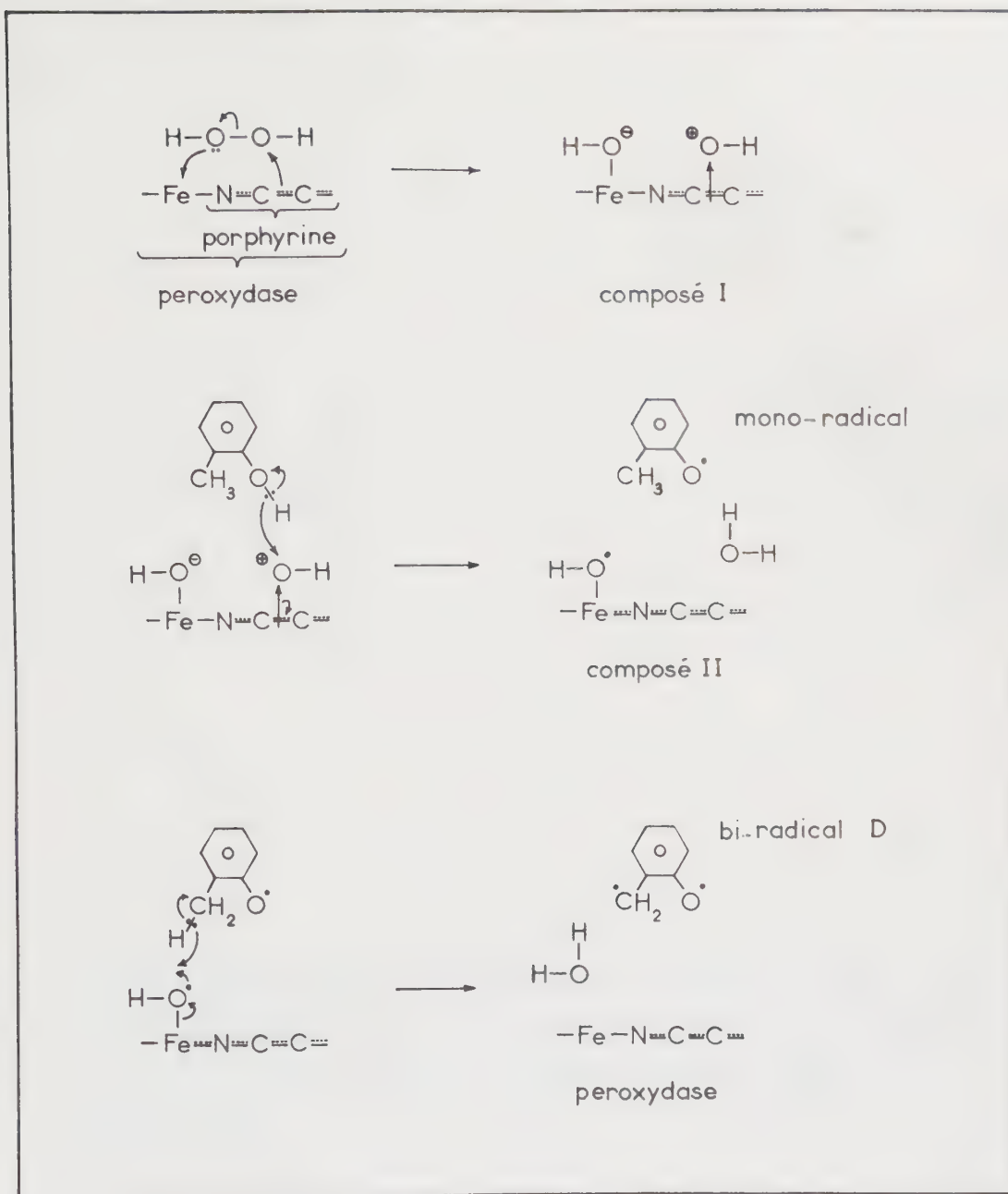


Figure 40

Mécanisme catalytique de l'oxydation du gaïacol par le système "peroxydase - eau oxygénée" supposant la participation du composé II.

ϕ_0	ϕ_1	ϕ_2	ϕ_{12}^i
$\frac{1}{k_3} + \frac{1}{k} + \frac{1}{k K_3}$	$\frac{1}{k_1}$	$\frac{1}{k_2} + \frac{1}{k_3 K_2} + \frac{1}{k K_2 K_3}$	$\frac{K_i}{k_1}$

TABLEAU IX

Signification des coefficients de DALZIEL (82) qui interviennent dans l'équation de vitesse fournie par le modèle enzymatique proposé dans la figure 39 (page 149).

fication des paramètres ϕ de DALZIEL est différente.

Le modèle que nous proposons présente l'avantage d'être le plus simple et de permettre la détermination de plusieurs constantes de vitesse.

L'hypothèse selon laquelle les deux équivalents oxydants, transportés par le composé I, peuvent être transférés directement sur un donneur d'électrons, sans intervention du composé II, a été démontrée en 1970 par THOMAS, MORRIS et HAGER (138) avec la chloroperoxydase. Les auteurs ont étudié l'oxydation, avec échange de deux électrons, de l'éthanol en acétaldéhyde catalysée par cet enzyme. En utilisant la technique d'écoulement interrompu (16), ils ont prouvé la non participation du composé II dans la réaction de transfert des deux équivalents oxydants, transportés par le composé I, sur le substrat. Cette preuve directe ne peut être apportée dans le cas de l'oxydation du gaïacol, en raison de la forte absorption du produit d'oxydation dans la région du spectre où les cinétiques de formation et de décomposition du composé II peuvent être enregistrées.

Les travaux de THOMAS et Coll. permettent donc de confirmer notre hypothèse et de mettre ainsi en doute, le modèle fondamental de CHANCE.

Dans le chapitre suivant nous considérerons l'oxydation d'un donneur d'électrons (le ferrocyclochrome c) qui, contrairement au gaïacol, ne peut échanger qu'un seul électron avec l'eau oxygénée.

CHAPITRE V

ETUDE DE L'OXYDATION DU FERROCYTOCHROME C CATALYSEE PAR L'ISOPEROXYDASE P₂ DE RAIFORT.

Le ferrocyclochrome c est un donneur d'électrons susceptible de céder un seul électron par molécule au cours de son oxydation. Sa forme oxydée (ferricytochrome c) étant parfaitement connue, c'est le substrat idéal pour l'étude cinétique de l'oxydation peroxydative, catalysée par les peroxydases, des donneurs d'électrons de ce type.

L'examen des différents modèles, relevés dans la littérature (chapitre I, page 30), susceptibles d'expliquer la cinétique de son oxydation, permet de penser que celle-ci s'effectue suivant un modèle unique, commun à toutes les peroxydases, qui a été décrit dans le chapitre I (figure 11, page 29). Cependant, la seule analyse détaillée de l'oxydation de ce donneur d'électrons, a été réalisée avec la cytochrome c peroxydase (89,108). Cette observation nous a incité à reprendre cette étude avec la peroxydase de raifort.

Dans ce chapitre, nous nous proposons de vérifier le mécanisme cité ci-dessus (figure 11, page 29) et de montrer ainsi que l'oxydation des donneurs d'électrons par les peroxydases s'effectue toujours, quel que soit le nombre d'électrons cédés par ces donneurs, avec formation intermédiaire d'un complexe ternaire actif.

I - Préparation du substrat "ferrocyclochrome c"

1) Purification du cytochrome c

Afin d'éviter l'autoxydation du ferrocyclochrome c

par le peroxyde en l'absence d'enzyme, signalée par BEETLESTONE (91) et NICHOLLS (90 , 110), et due à la présence de ferricytochrome c selon MOCHAN et DEGN (88) ou à une mauvaise purification selon YONETANI et RAY (89), nous avons purifié le cytochrome c par la méthode de MARGOLIASH (93 , 139 , 140).

On obtient la séparation des formes autoxydables du cytochrome c par chromatographie sur un échangeur d'ions. Pour cela 120 mg de cytochrome c sont mis en solution dans 5 ml de tampon phosphate de sodium 0,05 M, pH 7. Quelques gouttes de ferricyanure de potassium sont ajoutées dans cette solution avant de la déposer sur une colonne d'Amberlite* CG 50 (H) équilibrée avec le même tampon. L'élution est effectuée à l'aide d'un gradient continu de force ionique de la manière indiquée sur le diagramme (figure 41 , page 155). Un seul pic est obtenu par lecture de l'absorbance à 550 nm. Le test de TSOU (118)(voir chapitre II , page 47) permet de montrer que le pourcentage de cytochrome c autoxydable est nul dans chaque fraction collectée. Malgré cela, seule la partie centrale du pic est recueillie, soit un volume de 80 ml.

La solution contenant le cytochrome c purifié est dialysée contre un tampon phosphate de sodium 0,01 M, pH 7, et lyophilisée.

* *

2) Réduction du cytochrome c purifié

La poudre obtenue (96 mg) est mise en solution dans 3 ml d'eau distillée et la solution est dialysée

* Nous indiquons le mode de préparation de cette résine dans le chapitre II (page 43).

** La méthode utilisée est celle préconisée par YONETANI et RAY (107).

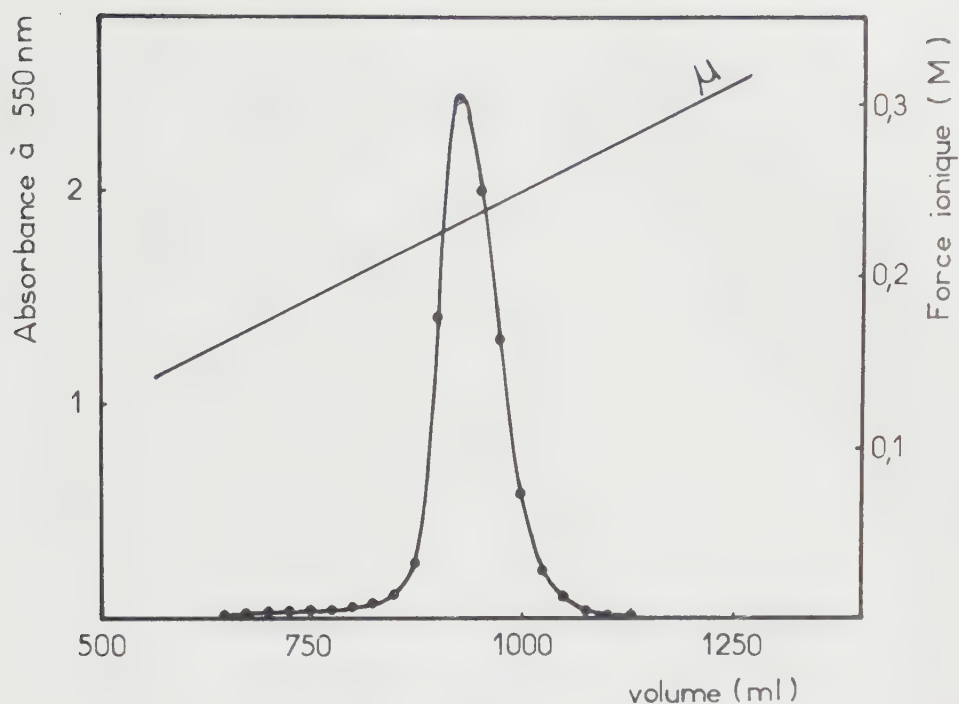


Figure 41

Purification du cytochrome c par chromatographie sur
Amberlite CG-50 (H).

On a déposé sur la colonne (2,5 cm x 25 cm) 5 ml de la solution de cytochrome c (24 mg par ml). Le volume de chaque fraction est de 5 ml; la vitesse d'écoulement est de 18 ml/h. La résine est équilibrée avec un tampon phosphate de sodium 0,05 M, pH 7. L'élution est conduite avec un gradient linéaire de NaCl dans le même tampon.

contre un tampon phosphate de sodium 0,01 M, pH 7. Après dialyse, le volume de la solution est porté à 5 ml avec le même tampon. On ajoute alors 10 mg d'EDTA pour éviter la séparation de l'hème du cytochrome (141) et on réduit ce dernier en rajoutant 500 mg d'hydrosulfite de sodium. La solution est ensuite filtrée sur une colonne de Sephadex G 25 pour éliminer l'hydrosulfite en excès. Afin d'éviter la réoxydation du ferrocytochrome c, le tampon d'élution est saturé en azote; de plus, seule la fraction la plus colorée de l'éluat est directement recueillie à la sortie de la colonne, dans un flacon parcouru par un courant d'azote. Pour cette raison nous ne pouvons représenter le diagramme d'élution. Le taux de réduction obtenu par cette méthode est en général compris entre 75 et 90 % .

II - Courbe de titrage du ferrocytochrome c par l'eau oxygénée en présence de l'isoperoxydase P_2 de raifort.

Il est capital de commencer cette étude cinétique par le titrage du ferrocytochrome c par l'eau oxygénée en présence de l'isoperoxydase P_2 de raifort. La courbe de titrage permet en effet (voir chapitre II) de déterminer le rapport des coefficients de stoechiométrie des réactifs et la constante d'équilibre de la réaction globale, données qui sont indispensables pour l'interprétation cinétique.

La courbe A de la figure 42 (page 157) représente la variation du pourcentage de forme oxydée du cytochrome c en fonction du rapport R des concentrations totales en eau oxygénée et en ferrocytochrome c. Cette courbe est

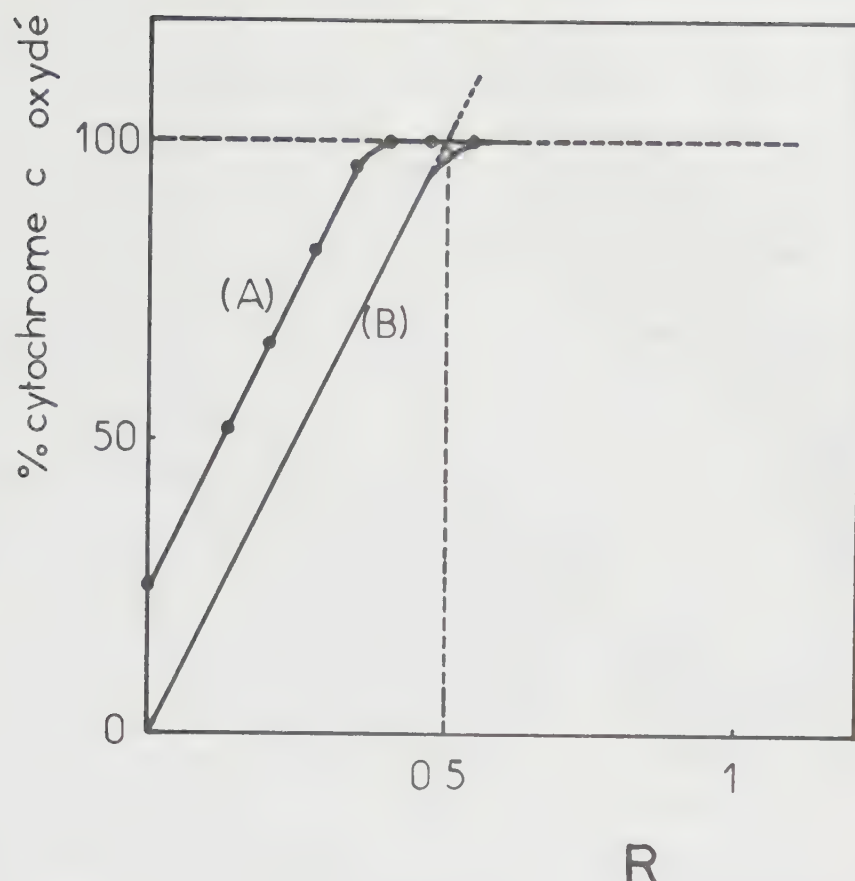


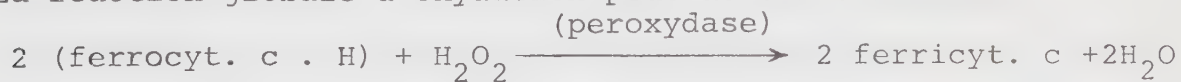
Figure 42

Courbe de titrage du ferrocytochrome c par l'eau oxygénée en présence de peroxydase P_2 de Raifort.

La courbe est obtenue en portant la variation du pourcentage de forme oxydée du cytochrome c en fonction du rapport R des concentrations initiales en eau oxygénée et en gaïacol ($R = [H_2O_2]_0 / [ferrocytochrome\ c]_0$). Ce pourcentage est calculé à partir des variations d'absorbance à 550 nm, en utilisant les valeurs des coefficients d'extinction moléculaire des formes oxydée et réduite du cytochrome c indiquées dans le chapitre II.

L'addition d'incréments d'eau oxygénée dans le milieu réactionnel (2,55 ml de tampon acétate de sodium 0,05 M, pH 5,6, contenant 0,056 μ mole de ferrocytochrome c et $0,55 \cdot 10^{-3}$ μ mole de peroxydase P_2 de Raifort) permet de faire varier R.

constituée de deux portions de droites concourantes : la première montre que le pourcentage de forme oxydée croît linéairement avec le rapport R et la seconde que si le cytochrome c est totalement oxydé, lorsque R croît, le pourcentage de forme oxydée reste constant. Cette constance exclut la possibilité d'une transformation quelconque du ferricytochrome c aux fortes concentrations en eau oxygénée. On peut remarquer que la première partie de la courbe A (figure 42, page 157), est une droite dont l'ordonnée à l'origine correspond au pourcentage de forme oxydée contenue dans la solution utilisée.* L'emploi d'une solution de cytochrome c totalement réduit aurait donné une courbe de titrage B (figure 42, page 157) déduite de la courbe A par une translation parallèle à l'axe des abscisses et telle que cette courbe B passe par l'origine. On remarque aisément que cette nouvelle courbe B présente une cassure nette pour R = 0,5. Les conclusions (page 64) relatives à l'examen des courbes théoriques de titrage d'un donneur d'électrons par l'eau oxygénée (figure 15, page 58) permettent de vérifier que la réaction d'oxydation du ferrocytochrome c s'effectue par la perte d'un seul électron par molécule oxydée. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par YONETANI (142) avec la cytochrome c peroxydase. L'auteur a en effet pu montrer que la concentration du ferrocytochrome c oxydé est précisément égale à la concentration des équivalents oxydants de l'eau oxygénée. La réaction globale d'oxydation peut donc s'écrire :



* Nous avons signalé précédemment (page 156) que la méthode de préparation du cytochrome c réduit permet d'obtenir des taux de réduction compris entre 75 et 90 %.

La comparaison de la courbe B de la figure 42 (page 157) avec le faisceau de courbes représenté dans le schéma A de la figure 15 (page 58) permet de conclure que la constante d'équilibre de cette réaction est supérieure à 10^4 M^{-1} . Cette estimation de la constante d'équilibre est extrêmement précieuse car elle permet de conclure que la réaction est très fortement déplacée dans le sens de l'oxydation. On peut donc penser que l'effet inhibiteur du produit de la réaction sur la vitesse initiale ne pourra se manifester qu'aux très fortes concentrations en ferricytochrome c.

III - Etude cinétique de la réaction d'oxydation du ferrocytochrome c par l'isoperoxydase P_2 de raifort.

1). Etude spectrophotométrique

Avant d'effectuer cette étude cinétique, il est intéressant de faire quelques remarques importantes .

- Le Turn-Over maximum de la peroxydase de raifort est beaucoup plus faible que celui de la peroxydase de levure. Le tableau X (page 160) donne les valeurs de ces T.N. fournies par différents chercheurs.

- Malgré la purification subie par le cytochrome c nécessaire pour éliminer, selon YONETANI et RAY (89), les formes autoxydables, nous avons constaté que l'oxydation du ferrocytochrome c par l'eau oxygénée n'est vraiment nulle, en l'absence de peroxydase, que pour des concentrations en eau oxygénée inférieures à $22 \mu\text{M}$. Cette constatation est en accord avec les résultats obtenus antérieurement par NICHOLLS et MOCHAN (110). Par contre, YONETANI et RAY (89) qui utilisent des solutions d'eau oxygénée contenant de l'EDTA (pour complexer vraisemblable-

T.N *	Peroxydase	tampon	température	référence
5	raifort	Acétate pH 4,7, 10 mM	20°C	CHANCE (103)
≥200	levure	Acétate pH 4,7, 10 mM	20°C	CHANCE (103)
16	levure	Acétate pH 7, 10 mM	20°C	BEETLESTONE (91)
2500 **	levure	Acétate pH 6, 50 mM	23°C	YONETANI, RAY (107)

TABLEAU X

Comparaison des Turn - Over des peroxydases de raifort et de levure

* Le Turn-Over est ici exprimé en mole de ferrocytochrome c oxydé par mole d'enzyme par seconde (soit en sec^{-1}).

** Cette valeur, très supérieure aux autres, est obtenue avec une cytochrome c peroxydase hautement purifiée par une méthode mise au point par YONETANI et RAY (107).

ment les traces de métaux qui pourraient provoquer sa décomposition) n'observent aucune " autoxydation " * pour des concentrations pouvant aller jusqu'à 176 μM . Il semblerait que l'EDTA soit responsable de l'élimination complète de cette "autoxydation". Ceci peut s'expliquer soit en admettant que certains métaux, à l'état de traces, peuvent jouer le rôle de l'enzyme et catalyser la réaction qui serait alors bloquée par l'EDTA, soit en admettant que cet agent complexant masque sélectivement les sites du ferrocytochrome c responsables de cette " autoxydation " .

Ces deux remarques nous ont conduit à utiliser :

- des concentrations en isoperoxydase P_2 relativement importantes (0,198 μM , en raison du faible T.N. de la peroxydase de raifort);
- des concentrations en eau oxygénée comprises entre 0,444 μM et 22 μM (concentrations inférieures à celles qui déclenchent l'oxydation non enzymatique du ferrocytochrome c par l'eau oxygénée).

Nous n'avons pas utilisé l'EDTA afin d'éviter une modification éventuelle du mécanisme d'action de l'enzyme en présence de cet agent complexant.

La limite inférieure de la concentration du cytochrome c réduit a été fixée à 2,22 μM (pour ne pas diminuer la précision des mesures de vitesse) et la limite supérieure à 22,2 μM (en raison de la trop forte absorbance des solutions au dessus de cette concentration qui rend les mesures impossibles).

* YONETANI et RAY désignent ainsi l'oxydation du ferrocytochrome c par l'eau oxygénée en l'absence d'enzyme.

Dans ces conditions, le rapport des concentrations $[\text{ferrocytochrome c}] / [\text{peroxydase}]$ est insuffisamment grand pour que l'on puisse admettre que le système "peroxydase, eau oxygénée, ferrocytochrome c" est à l'état stationnaire (143). Ceci est d'ailleurs confirmé par le fait que la vitesse initiale de la réaction n'est pas proportionnelle à la concentration en enzyme (figure 43, page 163).

L'allure des cinétiques obtenues est différente selon la valeur du rapport R des concentrations initiales en eau oxygénée et en ferrocytochrome c.

- Lorsque ce rapport R est supérieur ou égal à 1/2, on observe (courbes a et b de la figure 44 A, page 164, et courbe e de la figure 44 B, page 164) une chute instantanée de l'absorbance, due à la dilution, suivie d'une diminution pratiquement linéaire en fonction du temps et ensuite d'une diminution d'allure exponentielle. On pourrait comparer cette allure des cinétiques à celles de l'oxydation de l'ascorbate et du ferrocytochrome c par la peroxydase de Raifort, décrites par YONETANI (142). L'auteur constate en effet que ces cinétiques présentent deux phases : une première phase rapide, suivie d'une deuxième beaucoup plus lente. Selon lui, la vitesse d'oxydation du ferrocytochrome c par le composé I est très grande et explique la présence d'une première phase rapide; la vitesse d'oxydation du ferrocytochrome c par le composé II est beaucoup plus faible et rend compte ainsi de la présence de la seconde phase lente. Un tel raisonnement ne peut être tenu que dans la mesure où les concentrations en enzyme et en donneur sont du même ordre de grandeur. Bien que le rapport $[\text{ferrocytochrome c}] / [\text{peroxydase}]$ utilisé dans nos expériences, ne soit pas assez grand pour que l'on puisse admettre un état stationnaire,

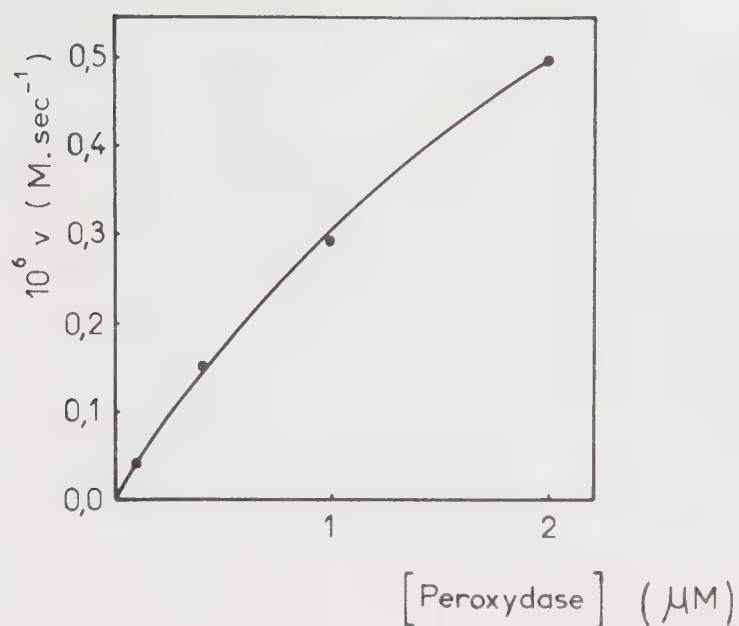


Figure 43

Effet de la concentration en peroxydase sur la vitesse d'oxydation du ferrocytochrome c par l'eau oxygénée.

La quantité de ferrocytochrome dans le milieu réactionnel est de 0,048 μmole; le volume final est de 4,63 ml; le pH (tampon acétate de sodium 0,05 M) de 5,6. L'isoperoxydase P₂ de Raifort a un R.Z. de 2,83.

La vitesse est mesurée selon la méthode indiquée dans le chapitre II.

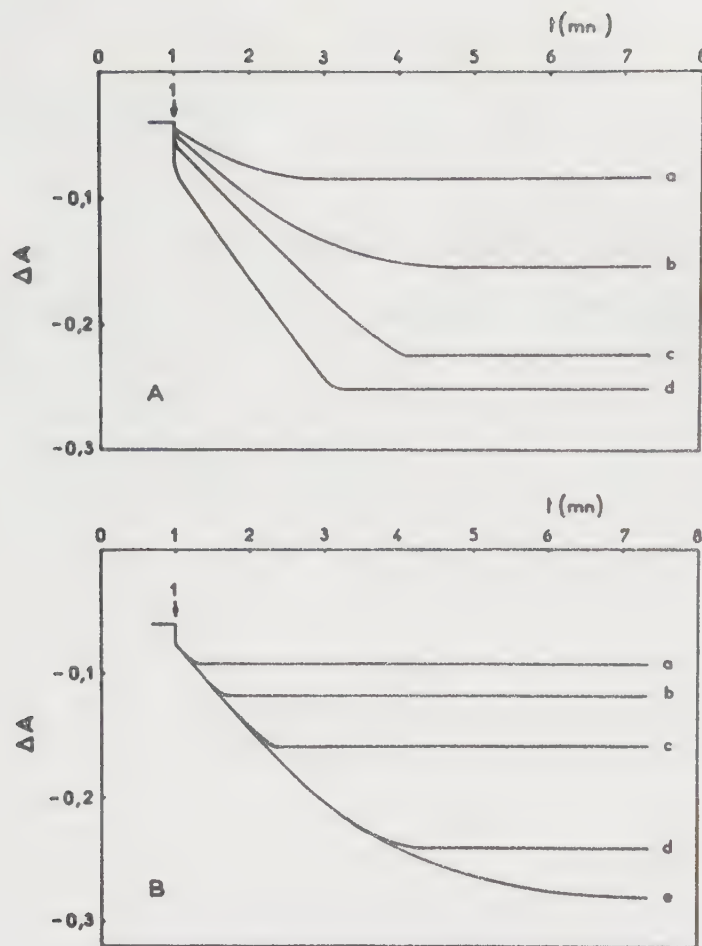


Figure 44

Cinétiques de l'oxydation du ferrocytochrome c par le système peroxydase - eau oxygénée.

A. Effet de la concentration en ferrocytochrome c sur la cinétique.

Les quantités respectives de peroxydase et d'eau oxygénée sont de $0,89 \cdot 10^{-3} \mu\text{mole}$, $0,02 \mu\text{mole}$; celles de ferrocytochrome c de $0,01 \mu\text{mole}$ (a), $0,025 \mu\text{mole}$ (b), $0,05 \mu\text{mole}$ (c), $0,1 \mu\text{mole}$ (d); le pH (tampon acétate de sodium $0,05 \text{ M}$) de 5,6; le volume final de 4,5 ml.

.../...

Figure 44 (suite)

B. Effet de la concentration en eau oxygénée sur la cinétique.

Les quantités respectives de peroxydase et de ferro-cytochrome c sont de $0,89.10^{-3}$ μ mole, 0,05 μ mole; celles d'eau oxygénée de 0,002 μ mole (a), 0,005 μ mole (b), 0,01 μ mole (c), 0,02 μ mole (d), 0,1 μ mole (e); le pH (tampon acétate de sodium 0,05 M) de 5,6; le volume final de 4,5 ml.

il est trop grand pour que le raisonnement tenu par YONETANI puisse être appliqué à nos résultats.

Nous avons d'ailleurs pu vérifier que la première phase de la cinétique correspond exactement à la dilution de ferrocytochrome c par l'eau oxygénée introduite dans le milieu réactionnel.

- Lorsque le rapport R est inférieur à $\frac{1}{2}$, l'allure des courbes est assez particulière. On observe (courbe c et d de la figure 44 A, page 164, et courbes a, b, c, d de la figure 44 B, page 164) une chute brutale de l'absorbance, suivie d'une variation linéaire en fonction du temps qui, au bout d'un certain temps, sans transition, devient constante. Dans ce cas, la phase exponentielle, que l'on peut observer sur les cinétiques obtenues pour des valeurs de R supérieures à $\frac{1}{2}$ est remplacée par une cassure de la courbe. Lorsque R a une valeur voisine de $\frac{1}{2}$ (R étant toujours inférieur à $\frac{1}{2}$, cette phase exponentielle apparaît, mais elle est alors partiellement tronquée (courbe d du schéma B de la figure 44, page 164). Lorsque R est inférieur à $\frac{1}{2}$, on constate d'autre part, qu'à l'équilibre, toute l'eau oxygénée est consommée et que la quantité de ferrocytochrome c oxydé est rigoureusement égale au double de celle de l'eau oxygénée consommée.

L'examen du schéma B de la figure 44 (page 164) permet de constater que pour une concentration fixée en ferrocytochrome c, la vitesse initiale de la réaction est indépendante de la concentration en eau oxygénée, ce qui, à priori, paraît difficilement explicable.

La figure 45 (page 166) représente la variation de la vitesse initiale de la réaction en fonction de la concentration en eau oxygénée, pour des concentrations variées en ferrocytochrome c. On peut constater que la vitesse initiale de la réaction varie avec la concentration en ferrocytochrome c. Les tracés primaires de LINEWEAVER -

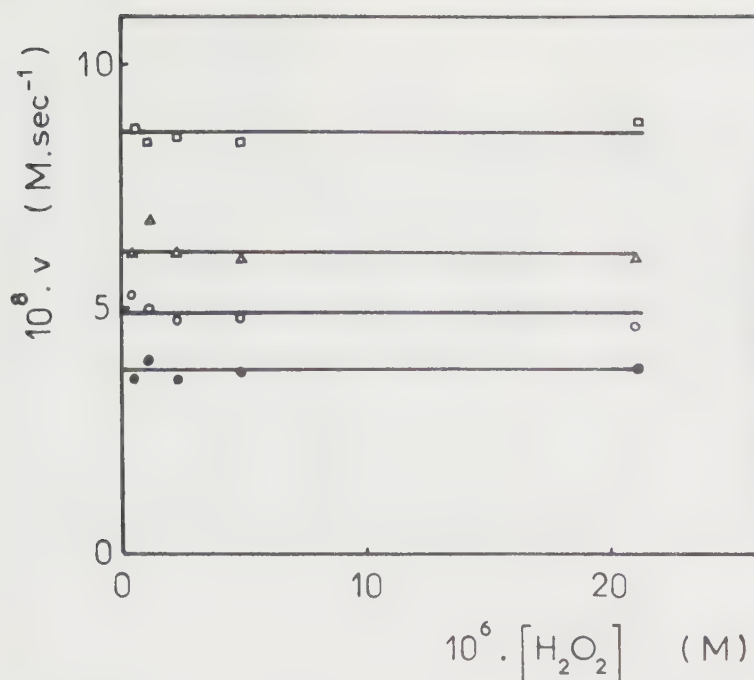


Figure 45

Effets du ferrocytochrome c sur les tracés primaires obtenus en fonction de l'eau oxygénée.

Les concentrations du ferrocytochrome c sont respectivement de $2,92 \cdot 10^{-6} \text{ M (}\bullet\text{)}$, $5,55 \cdot 10^{-6} \text{ M (}\circ\text{)}$, $11,1 \cdot 10^{-6} \text{ M (}\Delta\text{)}$, $22,2 \cdot 10^{-6} \text{ M (}\square\text{)}$; le pH (tampon acétate de sodium $0,05 \text{ M}$) de 5,6; le volume final de 4,5 ml; la concentration en isoperoxydase P_2 de Raifort de $0,198 \cdot 10^{-6} \text{ M}$.

BURK (109) $\frac{[E]_0}{v} = f \left(\frac{1}{[cyt\ c\ red.]} \right)$, pour des concentrations variées en eau oxygénée, sont représentés dans la figure 46 (page 168). La vitesse initiale de la réaction étant indépendante de la concentration en eau oxygénée, les tracés se superposent. On peut remarquer que le tracé commun n'est pas linéaire.

Nous allons montrer maintenant que ces résultats, de prime abord assez curieux, ne sont pas en contradiction formelle avec les résultats théoriques prévus par le modèle proposé (figure 11, page 29).

L'expression de la vitesse initiale à l'état stationnaire fournie par ce modèle est donnée par la relation

$$\frac{[E]_0}{v} = \frac{1}{k_4} + \frac{1}{k_1} \times \frac{1}{[S]} + \left(\frac{1}{k_2} + \frac{1}{k_3} + \frac{k_{-3}}{k_3 k_4} \right) \times \frac{1}{[AH]} \quad [43]$$

dans laquelle S représente l'eau oxygénée et AH représente le ferrocytochrome c.

Ce modèle prévoit des tracés primaires $\frac{[E]_0}{v} = f \left(\frac{1}{[AH]} \right)$ linéaires, mais seulement dans le cas où l'on a bien un état stationnaire. Or nous avons vu plus haut (page 161) qu'on ne pouvait réunir les conditions ($[substrat] \gg [enzyme]$) permettant de réaliser cet état. Il est donc tout à fait normal que ces tracés ne soient pas linéaires.

Le modèle prévoit aussi que la vitesse varie avec la concentration en eau oxygénée. On peut cependant remarquer que l'expression de $\frac{[E]_0}{v}$ fournie par l'équation [43] peut devenir indépendante de la concentration en

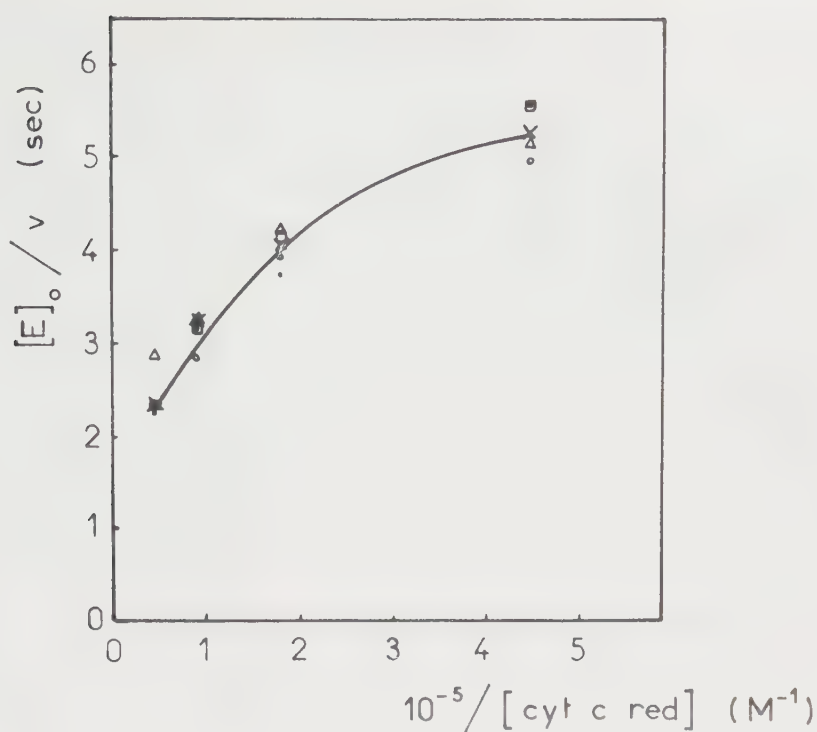


Figure 46

Effets de l'eau oxygénée sur les tracés primaires obtenus en fonction du ferrocytochrome c.

Les concentrations de l'eau oxygénée sont respectivement de $0,444 \cdot 10^{-6} M$ (Δ), $1,11 \cdot 10^{-6} M$ (x), $2,22 \cdot 10^{-6} M$ ($\square$), $4,44 \cdot 10^{-6} M$ (o), $22,2 \cdot 10^{-6} M$ (•); le pH (tampon acétate de sodium 0,05 M) de 5,6; le volume final de 4,5 ml; la concentration en isoperoxydase P_2 de Raifort de $0,198 \cdot 10^{-6} M$.

eau oxygénée si l'on admet que la constante de vitesse k_1 est très grande devant les constantes de vitesse k_2, k_3, k_4 . Comme les concentrations en eau oxygénée et en ferrocyclochrome c utilisées varient dans un même domaine qui, de plus, est relativement étroit (page 161), le terme $\frac{1}{k_1 [S]}$ peut être, alors, considéré comme

négligeable devant les autres et tout se passe, en pratique, comme si la vitesse était indépendante de la concentration en eau oxygénée. Pour pouvoir observer une variation de la vitesse en fonction de la concentration en eau oxygénée, il faudrait diminuer l'importance relative du terme en $\frac{1}{[AH]}$. Cela pourrait être réalisé en augmentant la concentration en ferrocyclochrome c mais, dans ce cas, nous avons vu (page 161) que la vitesse de la réaction n'est plus mesurable. On pourrait aussi envisager d'augmenter l'importance relative du terme en $\frac{1}{[S]}$ en diminuant la concentration en eau oxygénée mais, dans ce cas, la vitesse tendrait à devenir nulle, ce qui ne résoudrait pas non plus le problème.

Il est important de noter que le raisonnement que nous venons de tenir, pour tenter d'expliquer l'invariance de la vitesse initiale de la réaction en fonction de la concentration en eau oxygénée, n'est pas absolument rigoureux car il repose sur l'utilisation d'une expression de vitesse à l'état stationnaire, état que nous ne sommes pas en mesure d'obtenir en pratique.

Le modèle proposé (figure 11, page 29) suppose par ailleurs, qu'aucun complexe abortif ne peut se former entre l'enzyme libre et le ferro ou le ferricytochrome c. Ceci semble confirmé par le fait que nous n'avons pas pu mettre en évidence ces complexes

par spectrophotométrie différentielle. L'absence de complexe peroxydase - ferricytochrome c est également confirmée par le fait que le ferrocyclochrome c n'est pas inhibiteur de la réaction. Ce résultat était d'ailleurs prévisible si l'on se souvient que la constante d'équilibre de la réaction globale a été estimée (page 159) supérieure à 10^4 M^{-1} . MOCHAN et NICHOLLS (112) ont pu aussi montrer, à l'aide d'une technique différente (tamisage moléculaire), que ce complexe ferricytochrome c - peroxydase ne se forme pas.

Les conditions expérimentales ne nous permettant pas de vérifier le modèle proposé (figure 11, page 29) par la cinétique à l'état stationnaire, nous avons été amenés à faire l'étude de ce modèle en le simulant sur un calculateur analogique.

2). Vérification du modèle réactionnel proposé par une simulation en calcul hybride analogique - numérique.

L'étude qui va suivre a pour but de vérifier non seulement le modèle proposé, mais aussi de montrer qu'un choix convenable de constantes de vitesse permet d'expliquer l'allure assez particulière des cinétiques enregistrées. Ce choix des constantes doit donc permettre d'obtenir les principaux résultats suivants .

- L'allure de la cinétique est exponentielle lorsque le rapport des concentrations initiales en eau oxygénée et en ferrocyclochrome c est supérieur ou égal à $\frac{1}{2}$, la première partie de cette exponentielle étant pratiquement linéaire.

- Lorsque R est inférieur à $\frac{1}{2}$ une cassure apparaît et la deuxième partie de l'exponentielle disparaît.

- La vitesse initiale de la réaction est indépendante de la concentration en eau oxygénée dans les conditions expérimentales décrites dans la figure 49 (page 179).

Afin de faciliter l'exposé, les concentrations des différents réactifs et produits seront représentées par des variables x indicées (figure 47, page 172).

Pour étudier la cinétique d'apparition du ferri-cytochrome c (x_7) ou de disparition du ferrocytochrome c (x_6), il faut écrire les équations différentielles correspondant au mécanisme et les intégrer. L'hypothèse de l'état stationnaire permet d'éviter cette intégration car le système d'équations différentielles dégénère en un système d'équations linéaires que l'on peut facilement résoudre (144). Cette hypothèse ne pouvant être formulée dans notre cas, l'intégration a été effectuée à l'aide d'un calculateur analogique EAI 8800 couplé à un calculateur numérique EAI 640. Ce dernier permet un pilotage automatique du calculateur analogique, un calcul répétitif à grande vitesse, et la visualisation des résultats en permanence sur oscilloscope. On peut voir ainsi instantanément l'influence des différentes constantes de vitesse sur l'allure des courbes $x_i = f(t)$.

Le schéma de la page 172 permet d'écrire les équations différentielles suivantes :

$$\frac{dx_1}{dt} = k_4 x_4 - k_1 x_1 x_5 \quad [44]$$

$$\frac{dx_2}{dt} = k_1 x_1 x_5 - k_2 x_2 x_6 \quad [45]$$

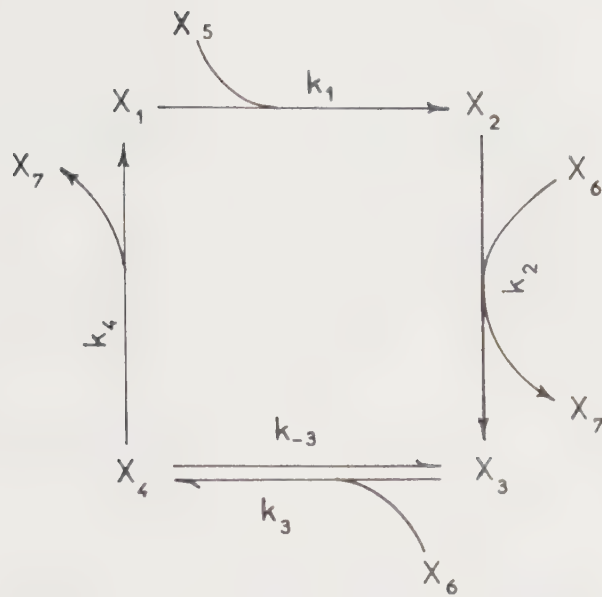


Figure 47

Représentation schématique du mécanisme de l'oxydation du ferrocyanochrome c par le système peroxydase - eau oxygénée.

Dans cette représentation schématique du mécanisme proposé (figure 11, page 29) les variables x_1 , x_2 , x_3 , x_4 , x_5 , x_6 , x_7 représentent respectivement la ferriperoxydase, le composé I, le composé II, le complexe composé II - ferrocyanochrome c, l'eau oxygénée, le ferrocyanochrome c, le ferricyanochrome c.

La concentration de l'eau libérée dans certaines étapes étant sans influence sur la vitesse de la réaction, la molécule d'eau n'est pas représentée.

$$\frac{dx_3}{dt} = k_2 x_2 x_6 + k_{-3} x_4 - k_3 x_3 x_6 \quad [46]$$

$$\frac{dx_4}{dt} = k_3 x_3 x_6 - k_4 x_4 - k_{-3} x_4 \quad [47]$$

$$\frac{dx_5}{dt} = -k_1 x_1 x_5 \quad [48]$$

$$\frac{dx_6}{dt} = -k_2 x_2 x_6 - k_3 x_3 x_6 + k_{-3} x_4 \quad [49]$$

$$\frac{dx_7}{dt} = k_4 x_4 + k_2 x_2 x_6 \quad [50]$$

Nous disposons par ailleurs de trois équations de conservation :

$$(x_1)_0 = x_1 + x_2 + x_3 + x_4 \quad [51]$$

$$(x_5)_0 = x_5 + x_2 + \frac{x_7 + x_3 + x_4}{2} \quad [52] *$$

$$(x_6)_0 = x_6 + x_7 + x_4 \quad [53]$$

L'équation [52] donne avec [51] :

$$x_7 = 2(x_5)_0 - (x_1)_0 - 2x_5 - x_2 - x_1 \quad [54]$$

Le nombre d'équations étant supérieur au nombre de variables, nous avons éliminé 3 équations différentielles plutôt que les équations de conservation. Ces dernières

* L'équation [52] correspond à une équation de conservation des équivalents oxydants de l'eau oxygénée.

imposent des contraintes aux circuits électriques du câblage et permettent ainsi de corriger les dérives des circuits instables.

Variables analogiques et "équations machines"

Afin de pouvoir tester le modèle pour différentes valeurs des paramètres (constantes de vitesse), ces dernières sont considérées comme des variables analogiques au même titre que les concentrations x_i .

Les valeurs maxima des concentrations des variables sont :

$$10^{-4}M \quad \text{pour } x_5, x_6, x_7$$

$$10^{-6}M \quad \text{pour } x_1, x_2, x_3, x_4$$

La valeur de k_1 a été prise égale à $0,8 \cdot 10^7$ (valeur obtenue grâce à l'étude cinétique de l'oxydation du gaïacol effectuée dans le chapitre IV et qui est peu différente de celle donnée par CHANCE : $0,89 \cdot 10^7$ (50, 135, 136). Les valeurs maxima des autres constantes sont :

$$\begin{array}{ll} 10^5 & \text{pour } k_2 \\ 10^5 & " \quad k_3 \\ 10 & " \quad k_{-3} \\ 10^3 & " \quad k_4 \end{array}$$

La liste complète des variables analogiques qui seront calculées peut ainsi être dressée :

$$\left[\frac{x_1}{10^{-6}} \right], \left[\frac{x_2}{10^{-6}} \right], \left[\frac{x_3}{10^{-6}} \right], \left[\frac{x_4}{10^{-6}} \right], \left[\frac{x_5}{10^{-4}} \right], \left[\frac{x_6}{10^{-4}} \right],$$

$$\left[\frac{x_7}{10^{-4}} \right], \left[\frac{k_1}{10^7} \right], \left[\frac{k_2}{10^5} \right], \left[\frac{k_3}{10^5} \right], \left[\frac{k_{-3}}{10} \right], \left[\frac{k_4}{10^3} \right].$$

La durée maximum de l'expérience étant de 300 sec, la variable analogique simulant le temps est $\left[\frac{T}{300} \right]$.

On réécrit le système formé par les équations [44], [45], [46], [48], [51], [53] et [54] en faisant apparaître les variables analogiques qui viennent d'être définies ; les valeurs de certains coefficients des équations différentielles "machine" étant de 1000, on ralentit le temps machine d'un facteur 100 pour avoir des coefficients inférieurs ou égaux à 10 (valeur maximum des gains des amplificateurs).

$$\frac{d}{d\tau} \left[\frac{x_1}{10^{-6}} \right] = -10 \left[\frac{k_1}{10^7} \right] \left[\frac{x_1}{10^{-6}} \right] \left[\frac{x_5}{10^{-4}} \right] + 10 \left[\frac{k_4}{10^3} \right] \left[\frac{x_4}{10^{-6}} \right] \quad [55]$$

$$\frac{d}{d\tau} \left[\frac{x_2}{10^{-6}} \right] = 10 \left[\frac{x_1}{10^{-6}} \right] \left[\frac{x_5}{10^{-4}} \right] \left[\frac{k_1}{10^7} \right] - 0,1 \left[\frac{k_2}{10^5} \right] \left[\frac{x_2}{10^{-6}} \right] \left[\frac{x_6}{10^{-4}} \right] \quad [56]$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{d\tau} \left[\frac{x_3}{10^{-6}} \right] &= 0,1 \left[\frac{k_2}{10^5} \right] \left[\frac{x_2}{10^{-6}} \right] \left[\frac{x_6}{10^{-4}} \right] + 0,1 \left[\frac{k_{-3}}{10} \right] \left[\frac{k_4}{10^{-6}} \right] \\ &\quad - 0,1 \frac{k_3}{10^5} \frac{x_6}{10^{-4}} \frac{x_3}{10^{-6}} \end{aligned} \quad [57]$$

$$\frac{d}{d\tau} \left[\frac{x_5}{10^{-4}} \right] = -10 \left[\frac{k_1}{10^7} \right] \left[\frac{x_1}{10^{-6}} \right] \left[\frac{x_5}{10^{-4}} \right] \quad [58]$$

$$\left[\frac{x_4}{10^{-6}} \right] = \left[\frac{(x_1)_0}{10^{-6}} \right] - \left[\frac{x_1}{10^{-6}} \right] - \left[\frac{x_2}{10^{-6}} \right] - \left[\frac{x_3}{10^{-6}} \right] \quad [59]$$

$$\left[\frac{x_7}{10^{-4}} \right] = \frac{2(x_5)_0 - (x_1)_0}{10^{-4}} - 2 \left[\frac{x_5}{10^{-4}} \right] - 0,01 \left[\frac{x_2}{10^{-6}} \right] + 0,01 \left[\frac{x_1}{10^{-4}} \right] \quad [60]$$

$$\left[\frac{x_6}{10^{-4}} \right] = \frac{(x_6)_0}{10^{-4}} - \left[\frac{x_7}{10^{-4}} \right] - 0,01 \left[\frac{x_4}{10^{-6}} \right] \quad [61]$$

Le schéma analogique correspondant à ce système d'équations est représenté dans la figure 48 (page 177). Il a été établi automatiquement à l'aide d'un programme "CHAMOI" mis au point au C.E.N. de Cadarache.

Résultats :

L'étude réalisée en calcul hybride a permis de montrer que la vitesse initiale de la réaction peut être pratiquement indépendante de la concentration en eau oxygénée si la constante de vitesse k_2 correspondant à l'étape de fixation de la première molécule de ferrocytochrome c sur le composé I (figure 11, page 29) est très inférieure à la constante de vitesse k_1 correspondant à la formation du composé I. La valeur relativement faible de la constante de vitesse k_2 ($k_2 = 5 \cdot 10^4$) (figure 49, page 179) fournie par cette étude n'est pas surprenante. En effet, la molécule de ferrocytochrome c étant une macromolécule, il est assez logique de penser que son encombrement stérique gêne considérablement sa fixation sur la peroxydase de Raifort. Notre étude a permis de vérifier différents faits expérimentaux exposés plus haut, qui, à priori, paraissaient difficilement explicables par le modèle proposé. Nous avons pu, en effet, vérifier que :

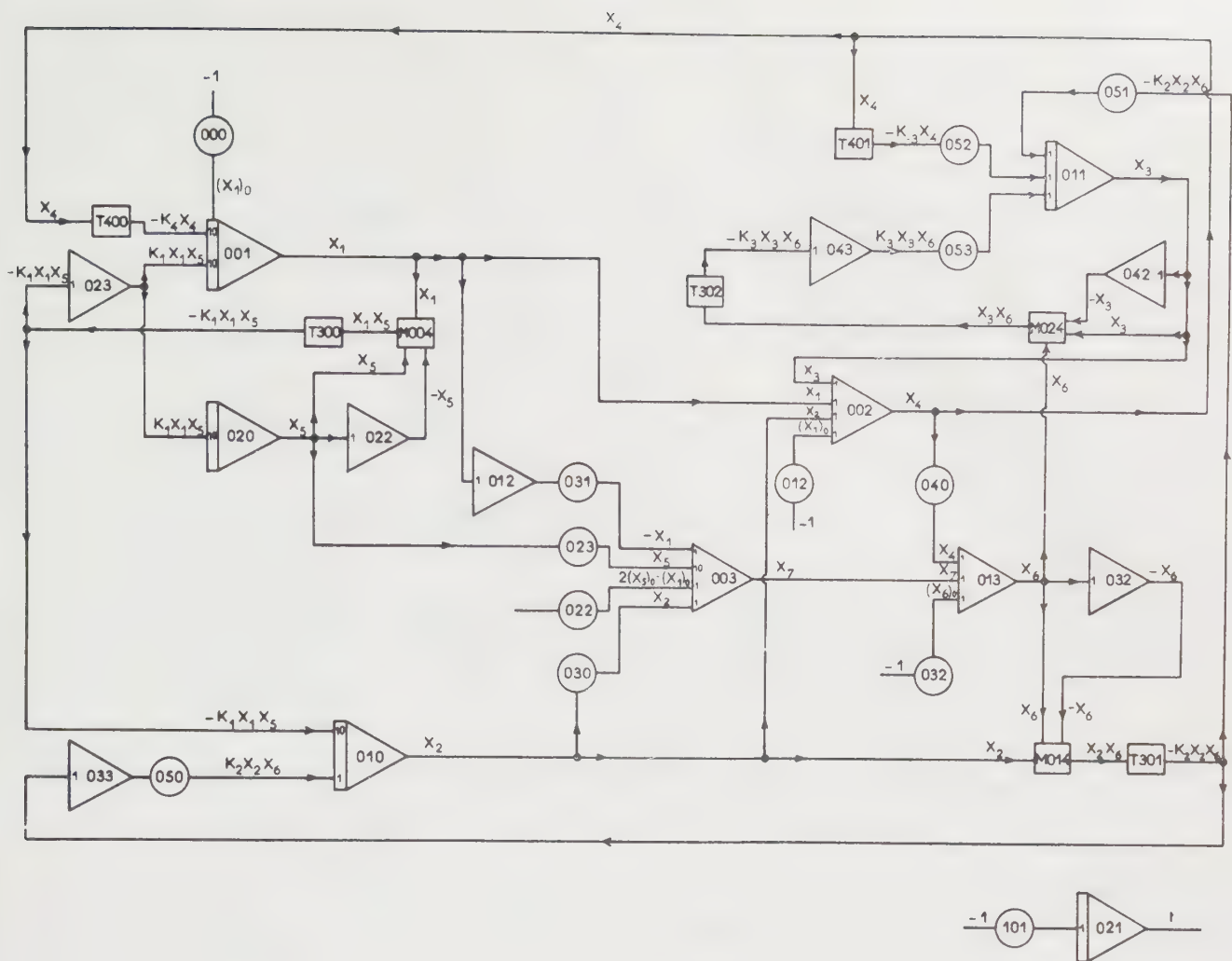


Figure 48

Plan du câblage du calculateur analogique EAI 8800-numérique EAI 640.

Ce plan de câblage correspond au modèle proposé pour l'oxydation peroxydative du ferrocyclochrome c par l'isoperoxydase P_2 de Raifort (figure 47, page 172). La signification des symboles est la suivante :

-  Intégrateur
-  Multiplieur
-  Sommateur
-  Potentiomètre
-  Multiplieur numérique-analogique (DAM). Ces éléments introduisent dans le calcul les valeurs de k_1 imposées par le calculateur numérique.

- lorsque le rapport R des concentrations initiales en eau oxygénée et en ferrocyclochrome c est supérieur ou égal à $\frac{1}{2} \left(\frac{(x_5)_0}{(x_6)_0} \geq \frac{1}{2} \right)$ on n'observe pas de cassure

dans les cinétiques ;

- si ce rapport est inférieur à $\frac{1}{2} \left(\frac{(x_5)_0}{(x_6)_0} < \frac{1}{2} \right)$,

la cassure apparaît sur les cinétiques. Dans ce cas la quantité de ferricyclochrome c (x_7) formé est égale au double de la quantité initiale d'eau oxygénée (x_5)₀.

La figure 49 (page 179) montre qu'un choix convenable des valeurs des paramètres permet d'obtenir des cinétiques théoriques qui se superposent avec une bonne précision aux cinétiques expérimentales obtenues par des mesures spectrophotométriques.

Il ne faut pas perdre de vue que le modèle proposé (figure 11, page 29) n'est sans doute qu'une image très simplifiée de la réalité. En particulier, le nombre d'étapes intervenant dans le phénomène est vraisemblablement supérieur à celui du modèle proposé. Les valeurs numériques des constantes de vitesse obtenues ne doivent être considérées que comme des constantes apparentes, dépourvues de toute signification physico-chimique. Les résultats expérimentaux et théoriques présentés confirment cependant l'idée fondamentale selon laquelle un complexe ternaire "peroxydase - eau oxygénée - ferrocyclochrome c" participe à la réaction.

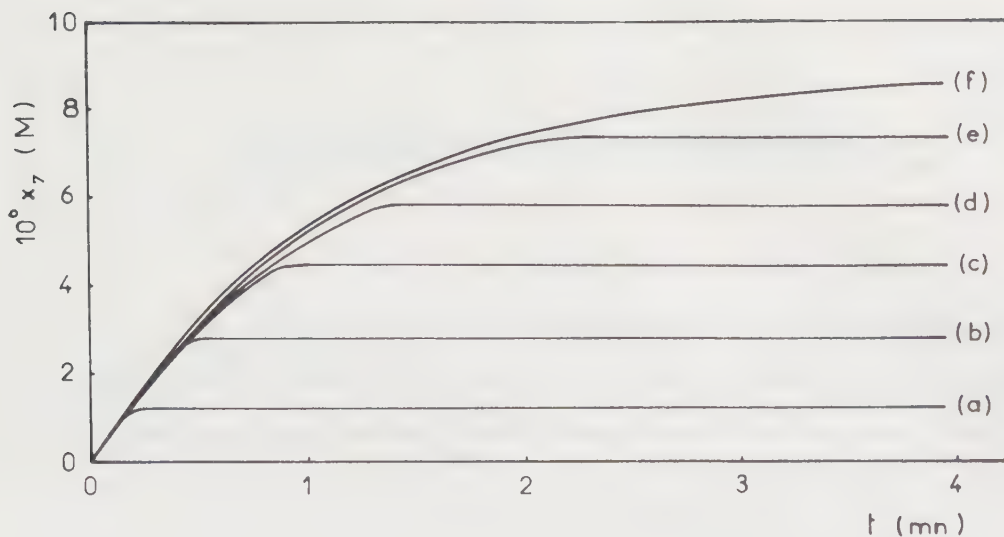


Figure 49

Cinétiques d'apparition du ferricytochrome c obtenues à l'aide du calculateur analogique EAI 8800 - numérique EAI 640.

Ces tracés ont été obtenus en prenant pour valeurs des constantes de vitesse les valeurs suivantes :

$$k_1 = 8.10^6 ; k_2 = 5.10^4 ; k_3 = 2.10^6 ; k_4 = 2.10^2 ; k_{-3} = 2$$

Les conditions initiales sont :

$$(x_1)_0 = 2.10^{-7} ; (x_6)_0 = 9.10^{-6} ; (x_7)_0 = 0 ;$$

$$(x_5)_0 = 0,6.10^{-6} \text{ (a)} ; 1,5.10^{-6} \text{ (b)} ; 2,25.10^{-6} \text{ (c)}$$

$$3,0.10^{-6} \text{ (d)} ; 3,7.10^{-6} \text{ (d)} ; 6.10^{-6} \text{ (f)}$$

RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES

Au terme des recherches qui viennent d'être exposées, il nous paraît utile de rappeler brièvement les principaux résultats auxquels nous avons abouti.

- Dans la peroxydase commerciale de Raifort, cinq peroxydases ont été mises en évidence. A pH 6,8 la peroxydase P_1 est acide et les peroxydases P_2 , P_3 , P_4 , P_5 sont basiques. L'une d'entre elles, P_2 , est nettement prépondérante dans le mélange; elle a été obtenue à l'état hautement purifié comme le montrent les électrophorégrammes et les diagrammes d'ultracentrifugation SCHLIEREN. Certaines de ses propriétés physico-chimiques telles que les caractéristiques spectrales, la masse moléculaire, la composition en amino-acides, ont été déterminées. D'après son spectre d'absorption, la peroxydase P_2 semble être un complexe "high spin" du fer.

- Les mécanismes d'oxydation peroxydative du gaïacol et du ferrocytochrome c catalysée par la peroxydase P_2 de Raifort ont été analysés en détail. La réaction d'oxydation peroxydative du gaïacol s'effectue selon un mécanisme qui diffère fondamentalement du schéma classique de THEORELL - CHANCE. En effet, contrairement à ce qui était généralement admis, le mécanisme proposé suppose un échange de deux électrons entre le composé I de la peroxydase et ce donneur.

- De plus, la formation d'un complexe ternaire

actif entre la peroxydase, l'eau oxygénée et le gaïacol a pu être démontrée par l'étude cinétique à l'état stationnaire.

- D'autre part, un complexe binaire abortif entre la peroxydase et le gaïacol a pu être mis en évidence par spectrophotométrie de différence. La valeur de la constante de stabilité de ce complexe, estimée par cette méthode, a été confirmée par l'étude cinétique.

- La nature du produit d'oxydation du gaïacol a pu être déterminée. Contrairement à ce qu'on pensait jusqu'à présent, sa structure est quinonique. Il est constitué de quatre noyaux aromatiques et se décompose à la lumière et aux fortes concentrations en gaïacol.

- Les valeurs de certaines constantes de vitesse impliquées dans le mécanisme enzymatique proposé ont été déterminées. La valeur ainsi obtenue pour la constante de vitesse de l'étape de formation du composé I est en bon accord avec celle proposée par CHANCE, et mesurée par la méthode d'écoulement interrompu.

- Le mécanisme proposé suppose que le produit initial d'oxydation est un bi-radical qui subit ensuite une polymérisation.

- La formation d'un complexe ternaire actif au cours des réactions d'oxydation peroxydative a pu être vérifiée, avec le ferrocyclochrome c comme donneur d'électrons, à l'aide d'un ordinateur hybride analogique-numérique. Un choix convenable des constantes de vitesse a permis d'obtenir des cinétiques théoriques qui se superposent exactement aux résultats expérimentaux. Cette concordance confirme l'hypothèse avancée, selon laquelle

la constante de vitesse de l'étape de fixation de la première molécule de ferrocytochrome c sur la peroxydase est relativement faible.

B I B L I O G R A P H I E

1. SAUNDERS, B.C., HOLMES-SIEDLE, A.G., et STARK, B.P.,
"Peroxidase", Butterworths, London, 1964
2. NARI, J., *Thèse de Doctorat d'Etat*, Faculté des Sciences
de l'Université d'Aix-Marseille, 1967.
3. THEORELL, H., *Ark. Kemi. Geol.*, 16 A, n° 2, 1942.
4. JERMYN, M.A., *Nature*, 169, 488, 1952.
5. JERMYN, M.A., and THOMAS, R., *Biochem. J.*, 56, 631, 1954.
6. DELINCEE, H., and RADOLA, B.J., *Biochim. Biophys. Acta*,
200, 404, 1970.
7. KASINSKY, H.E., and HACKETT, D.P., *Phytochem.*, 7, 1147, 1965.
8. KLAPPER, M.H., and HACKETT, D.P., *Biochim. Biophys. Acta*,
96, 272, 1965.
9. SHANNON, L.M., KAY, E., and LEW, J.Y., *J. Biol. Chem.*,
241, 2166, 1966.
10. KEILIN, D., HARTREE, E.F., *Biochem. J.*, 49, 88, 1951.
11. KENTEN, R.H., and MANN, P.J.G., *Biochem. J.*, 57, 347, 1954.
12. PAUL, K.G., *Acta Chem. Scand.*, 12, 1312, 1958.
13. PAUL, K.G., and STIGBRAND, T., *Acta Chem. Scand.*, 24,
3607, 1972.
14. THEORELL, H., *Enzymologia*, 10, 250, 1941.
15. KEILIN, D., and MANN, T., *Proc. Roy. Soc. (London)*, Ser.B,
122, 119, 1937.
16. HARTRIDGE, H., and ROUGHTON, F.J.W., *Proc. Camb. Phil. Soc.*,
23, 450, 1923.
17. CHANCE, B., *Science*, 92, 455, 1940.

18. CHANCE, B., *J. Biol. Chem.*, 151, 533, 1943.
19. CHANCE, B., *Arch. Biochem. Biophys.*, 24, 389, 1949.
20. CHANCE, B., *Arch. Biochem. Biophys.*, 41, 404, 1952.
21. GEORGE, P., *Adv. Catalysis*, 4, 367, 1952.
22. GEORGE, P., *Biochem. J.*, 54, 267, 1953.
23. GEORGE, P., *Biochem. J.* 55, 220, 1953.
24. CHANCE, B., *Arch. Biophys.*, 37, 235, 1952.
25. THEORELL, H., *Ark. Kemi. Min. Geol.*, 15 B, n° 23, 1942.
26. CECIL, K., and OGSTON, A.G., *Biochem. J.*, 49, 105, 1951.
27. MAEHLI, A.C., *Methods Enzymol.*, 2, 801, 1955.
28. WHITAKER, J.R., *Anal. Chem.*, 35, 1950, 1963.
29. SPACKMAN, D.H., STEIN, W.H., and MOORE, S., *Anal. Chem.*, 30, 1185, 1958.
30. THEORELL, H., and ÅKESSON, A., *Arkiv. Mineral. Geol.*, 16, n° 8, 1943.
31. MAEHLI, A.C., and PALEUS, S., *Acta Chem. Scand.*, 4, 508, 1950.
32. MORITA, Y., and KAMEDA, K., *Bull. Agr. Chem. Soc., Japan*, 23, 8, 1959.
33. LIU, E.H., and LAMPORT, D.T.A., *Plant Physiol.*, 43, Suppl. S 16, 1968.
34. WELINDER, K.G., SMILLIE, L.B., *Can. J. Biochem.*, 50, 63, 1972.
35. WELINDER, K.G., SMILLIE, L.B., and SCHONBAUM, G.R., *Can. J. Biochem.*, 50, 44, 1972.
36. STICKLAND, E.H., KAY, E., SHANNON, L.M., and HORWITZ, J., *J. Biol. Chem.*, 243, 3560, 1968.
37. STICKLAND, E.H., *Biochim. Biophys. Acta*, 151, 70, 1968.

38. WEINRYB, I., *Arch. Biochem. Biophys.*, 124, 285, 1968.
39. BRILL, A.S., and WEINRYB, I., *Biochemistry*, 6, 3528, 1967.
40. HUNT, L.T., and DAYHOFF, M.O., *Biophys. Res. Commun.*, 39, 757, 1970.
41. BRILL, A.S., and WILLIAMS, R.J.P., *Biochem. J.*, 78, 246, 1961.
42. RICARD, J., MAZZA, G., and WILLIAMS, R.J.P., *European. J. Biochem.*, 31, 14, 1972.
43. SHIH, J.H.C., SHANNON, L.M. KAY, E., and LEW, J.Y., *J. Biol. Chem.*, 246, 4566, 1971.
44. GEORGE, P., and LYSTER, R.L.J., *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.*, 44, 1013, 1958.
45. NICHOLLS, P., *Biochim. Biophys. Acta*, 60, 217, 1962.
46. MANN, P.J.G., *Biochem. J.*, 24, 918, 1931.
47. CHANCE, B., in E.S.B. BARRON (Editor), *Modern trends in physiology and biochemistry*, Academic Press Inc., New-York, p. 25, 1952.
48. CHANCE, B., "Investigation of Rates and Mechanism of Reactions" edited by FRIESS, S.L., and WEISSBERGER, A., published by the Interscience Publishers, New-York, p. 627, 1953.
49. CHANCE, B., and FERGUSON, R.R., "A Symposium on the Mechanism of Enzyme Action" edited by Mc ELROY, W.D., and GLASS, B., published by the Johns HOPKINS Press, Baltimore, p. 389, 1954.
50. CHANCE, B., and MAEHLI, A.C., "Methods in Enzymology", edited by COLOWICK, S.P., and KAPLAN, N.O., published by the Academic Press Inc., New-York, p. 801, 1955.
51. BACH, R., and CHODAT, A.N., *Arch. Sci. Phys. Nat.*, 42, 56, 1916.
52. MANN, P.J.G., *Biochem. J.*, 25, 918, 1931.

53. UCKO, H., and BANSI, H.W., *Z. Physiol. Chem.*, 159, 235, 1926
54. BERTRAND, C.R., *Bull. Soc. Chim. France*, 31, 185, 1904.
55. BERTRAND, C.R., *C. R. Acad. Sci. Paris*, 137, 1270, 1903.
56. BERTRAND, C.R., *Ann. Inst. Pasteur*, 18, 116, 1904.
57. BOTH, H., and SAUNDERS, B.C., *J. Chem. Soc.*, Part I, 940, 1956.
58. KAR, J. *Indian Chem. Soc.*, 14, 291, 1937.
59. FICHTER, and DIETRICH, *Helv. Chim. Acta*, 7, 137, 1924.
60. TEUBER, H.J., and JELLINCK, *Chem. Ber.*, 85, 95, 1952.
61. WESSELY, F., and KOLTAN, J., *Monatsh*, 84, 291, 1953.
62. TEUBER, H.J., and RAU, W., *Ber.*, 86, 1036, 1953.
63. ROY, R.B., and SWAN, G.A., *J. Chem. Soc.*, (1), 83, C, 1968.
64. PENNINGTON and RITTER, *J. Amer. Chem. Soc.*, 69, 187, 1947.
65. STUMPF, W., and RUMPF, G., *Ann.*, 599, 51, 1956.
66. FEIFER, J.P., SMITH, M.A., and WILLEFORD, B.R., Jr., *J. Org. Chem.*, 24, 90, 1959.
67. ADLER, E., MAGNUSSON, R., *Acta Chem. Scand.*, 13, 505, 1959.
68. ADLER, E., FALKEHAG, I., and SMITH, B., *Acta Chem. Scand.*, 16, 529, 1962.
69. BEHRMAN, E.J., *J. Am. Chem. Soc.*, 85 (21), 3478, 1963.
70. CHUDAKOV, M.I., and MILOVANOV, A.V., *Khim. Pererabotka Drevesiny. Ref. Inform.*, N° 26, 9, 1965.
71. SAKAI, K., and KONDON, T., *Nippon Mokuzai Gakkaishi*, 12 (1), 57, 1966.
72. GIANOLA, G., and MEYBECK, J., *Asso. Tech. ind. papetière, Bull.*, N° 1, 25, 1960.

73. MURPHY, R.A., KAHEHI, K., and SARKANEN, K.V., *Tappi*, 44, 465, 1961.
74. PAPOUCHADO, L., BACON, J., ADAMS, R.N., *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, 24 (1), App. 1-5, 1970.
75. JERMYN, M.A., and THOMAS, R., *Biochem. J.*, 56, 631, 1954.
76. LINDGREN, B.O., *Acta Chem. Scand.*, 14, 2089, 1960.
77. HEWGILL, F.R., and MIDDLETON, B.S., *J. Chem. Soc., C*, 2316, 1967.
78. HEWGILL, F.R., and LEE, S.L., *J. Chem. Soc., C*, 2080, 1969.
79. DOU, H.J.M., VERNIN, G., et METZGER, J., *Bull. Soc. Chim. France*, 12, 4593, 1971.
80. MUCAHY, M.F.R. et WILLIAMS, D.J., *Austral. J. Chem.*, 18, 20, 1965.
81. HOSOYA, T., *J. Biochem. Tokyo*, 47, 794, 1960.
82. DALZIEL, K., *Acta Chem. Scand.*, 11, 1706, 1957.
83. EHRENBERG, A., and THEORELL, H., *Acta Chem. Scand.*, 9, 1193, 1955.
84. KEILIN, D., and HARTREE, E.F., *Biochem. J.*, 49, 88, 1951.
85. GEORGE, P., and IRVINE, D.H., *Nature*, 168, 164, 1961.
86. NAKAMURA, Y., SAMEJIMA, T., KURIHARA, K., TOKJO, M., and SHIBATA, K., *J. Biochem. Tokyo*, 48, 862, 1960.
87. FLATMARK, T., *Acta Chem. Scand.*, 20, 1470, 1966.
88. MOCHAN, E., and DEGN, H., *Biochim. Biophys. Acta*, 189, 354, 1969.
89. YONETANI, T., and RAY, G.S., *J. Biol. Chem.*, 241, 700, 1966.
90. NICHOLLS, P., *Arch. Biochem. Biophys.*, 106, 25, 1964.
91. BEETLESTONE, J., *Arch. Biochem. Biophys.*, 89, 35, 1960.

92. MARGOLIASH, E., *Biochem. J.*, 56, 535, 1954.
93. MARGOLIASH, E., and LUSTGARTEN, J., *J. Biol. Chem.*, 237, 3397, 1962.
94. MARGOLIASH, E., FROHWIRT, N., and WIENER, E., *Biochem. J.*, 71, 559, 1959.
95. SCHEJTER, A., GLAUSER, S.C., GEORGE, P., and MARGOLIASH, E., *Biochim. Biophys. Acta*, 73, 641, 1963.
96. THEORELL, H., and ÅKESSON, A., *Science*, 90, 67, 1939.
97. SCHEJTER, A., and GEORGE, P., *Biochemistry*, 3, 1045, 1964.
98. GREENWOOD, C., and PALMER, G., *J. Biol. Chem.*, 240, 3360, 1965.
99. WILSON, M.T., and GREENWOOD, C., *Eur. J. Biochem.*, 22, 11, 1971.
100. GREENWOOD, C., and WILSON, M.T., *Eur. J. Biochem.*, 22, 5, 1971.
101. THEORELL, H., and ÅKESSON, A., *J. Amer. Chem. Soc.*, 63, 1812, 1941.
102. ALTSCHUL, A.M., ABRAMS, R., and HOGNESS, T.R., *J. Biol. Chem.*, 136, 777, 1940.
103. CHANCE, B., in "Enzymes and Enzyme Systems" (J.T. EDSALL, ed.) p. 93, Harvard Univ. Press, Cambridge, Massachusetts, 1951.
104. GEORGE, P., *Nature*, 169, 612, 1952.
105. NICHOLLS, P., *Arch. Biochem. Biophys.*, 106, 25, 1964.
106. ABRAMS, R., ALTSCHUL, A.M., and HOGNESS, T.R., *J. Biol. Chem.*, 142, 303, 1942.
107. YONETANI, T., and RAY, S., *J. Biol. Chem.*, 240, 4503, 1965.
108. YONETANI, T., *J. Biol. Chem.*, 240, 4509, 1965.

109. LINEWEAVER, H., and BURK, D.J., *Amer. Chem. Soc.*, 56, 658, 1964.
110. NICHOLLS, P., and MOCHAN, E., *Biochem. J.*, 121, 55, 1971.
111. NICHOLLS, P., and MOCHAN, E., *Nature New Biol.*, 230, 276, 1971.
112. MOCHAN, E., and NICHOLLS, P., *Biochem. J.*, 121, 69, 1971.
113. MAZZA, G., CHARLES, Cl., BOUCHET, M., RICARD, J., RAYNAUD, J., *Biochim. Biophys. Acta*, 167, 89, 1968.
114. SLONIMSKI, P., *Communication personnelle*.
115. VAN DUIJN, P., *Rec. Trav. Chim.*, 74, 771, 1955.
116. KON, S., and WHITAKER, J.R., *J. Food. Sci.*, 30, 977, 1965.
117. KOLTHOFF, I.M., and BELCHER, R., (Editors), in *Volumetric Analysis*, Vol. III, Interscience Publishers, Inc. New-York, p. 75, 1957.
118. TSOU, C.L., *Biochem. J.*, 49, 362, 1951.
119. TEALE, F.W., *Biochim. Biophys. Acta*, 35, 543, 1959.
120. HIRS, C.N.W., *J. Biol. Chem.*, 219, 611, 1956.
121. YPHANTIS, D.A., *Biochemistry*, 3, 297, 1964.
122. *Bibliothèque de programmes I.B.M.*, p. 161.
123. YOE, J.H., and JONES, A.L., *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 16, 111, 1944.
124. ANDREWS, P., *Biochem. J.*, 91, 222, 1964.
125. WARD, D.N., and ARNOFF, M.S., *Anal. Biochem.*, 12, 296, 1965.
126. MAZZA, G., *Thèse de Doctorat d'Etat*, Faculté des Sciences, Marseille, 1971.
127. YAMAZAKI, I., NAKAJIMA, R., HONMA, H., TAMURA, M., in "Structure and function of cytochromes" (Edited by OKUNUKI, K., KAMEN, M.D., et SEKEZU, I.) University of

Tokyo, University of Park Press, Baltimore, Maryland and Manchester, England, p. 552, 1968.

128. GEORGE, P., *J. Biol. Chem.*, 201, 413, 1953.
129. RICARD, J., SANTIMONE, M., et VOGT, G., *C.R. Acad. Sc. Paris*, 267, 1414, 1968.
130. NUNEZ, J., and POMMIER, J., *Eur. J. Biochem.*, 5, 114, 1968.
131. BJORKSTEN, F., *Eur. J. Biochem.*, 5, 133, 1968.
132. CLELAND, W.W., *Biochim. Biophys. Acta*, 67, 104, 1963.
133. LOTH, H., *Arch. Pharmaz.*, 295, 115, 1962.
134. HALDANE, J.B.S., *Enzymes*, Longmans, Green, London, 80, 1930.
135. CHANCE, B., *Arch. Biochem.*, 22, 224, 1949.
136. CHANCE, B., *Advance Enzymol.*, 12, 153, 1951.
137. CHANCE, B., *Mechanism of Enzyme Action*, (Ed. W.D. Mc ELROY and B. GLASS) Johns Hopkins Press, Baltimore, p. 389, 1954.
138. THOMAS, J.A., MORRIS, D.R., HAGER, L.P., *J. Biol. Chem.*, 245, 3135, 1970.
139. MARGOLIASH, E., *Biochem. J.*, 56, 529, 1953.
140. MARGOLIASH, E., *Biochem. Prep.*, 5, 33, 1957.
141. MARGOLIASH, E., *Methods in Enzymology*, Vol. X, 339, 1967.
142. YONETANI, T., *J. Biol. Chem.*, 241, 2562, 1966.
143. WONG, J.T.F., *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 1788, 1965.
144. KING, E.L., ALTMAN, C., *J. Phys. Chem.*, 60, 1375, 1956.

